INSTITUTUL DE CERCETĂRI
PENTRU CEREALE ŞI PLANTE TEHNICE - FUNDULEA

CERCETĂRI DE GENETICĂ VEGETALĂ ŞI ANIMALĂ

VOLUMUL IV

1996

Scanned with OKEN Scanner

ACADEMIA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI SILVICE
„GH. IONESCU ȘIȘEȘTI"
INSTITUTUL DE CERCETĂRI PENTRU CEREALE
ȘI PLANTE TEHNICE
FUNDULEA

CERCETĂRI DE GENETICĂ VEGETALĂ ȘI ANIMALĂ

Vol. IV

Scanned with OKEN Scanner

COMITETUL DE REDACȚIE:

Redactor responsabil: dr. doc. **Alexandru Viorel Vrânceanu**
(I.C.C.P.T. – Fundulea)
Membri: dr. doc. **Vasile Cociu** (I.C.P.P. Mărăcineni)
dr. doc. **Valeriu Enescu** (I.C.A.S. Bucureşti)
prof. dr. doc. **Petre Raicu** (Universitatea din Bucureşti)
dr. doc. **Paul Varga** (I.C.C.P.T. – Fundulea)

Scanned with OKEN Scanner

CERCETĂRI DE GENETICĂ VEGETALĂ ŞI ANIMALĂ

Vol. IV

1996

CUPRINS

Prefaţă 7

A. GH. JACOTĂ, N. I. BĂRBĂCARU, RODICA ENACHI – Aspecte molecular-genetice ale reacţiei plantelor la stresul termic 9

C. V. ZĂNOAGĂ, CRISTINA PĂUN, TATIANA BÂRLEANU – Aspecte citogenetice, mediate redox, ale poluării biologice 19

I. DECUSEARĂ, A. GH. JACOTĂ – Modelarea reglării genetice a reacţiei organismelor la temperaturi supraoptime 27

IOANA HAGIMA, ELENA MARCELA BADEA, IRINA HOLOBIUC – Evaluarea diversităţii genetice generate de cultura *in vitro* la grâu prin intermediul unor markeri moleculari 35

A. GIURA, N. N. SĂULESCU – Identificarea cromozomilor implicaţi în ereditatea dimensiunilor boabelor la un genotip de grâu cu boabe mari 43

ALEXANDRINA MIHĂILESCU, A. GIURA, AL. BUDE – Progrese în obţinerea de haploizi şi linii homozigote dublu haploide (DH) la orzul şi orzoaica de toamnă 49

G. NEDELEA, DORICA BOTĂU, A. PERES, AURUŢA DÂRLEA, E. MADOŞA – Cercetări privind influenţa genotipului asupra capacităţii de regenerare la *Avena sativa*. 65

A. ROTARI, GALINA COMAROV, I. FRUNZE, M. OLIVERA PARI – Identificarea liniilor homozigote de porumb după polimorfismul genetic al zeinei 71

NINA FRUNZE – Inducerea plantulelor prin androgeneză la porumb 81

GALINA COMAROV, I. ANTIBOR, A. ROTARI, N. CLIMENCO – Cercetări electroforetice ale proteinelor zeinice în procesul variabilităţii somaclonale la porumb 85

I. HAŞ, I. CĂBULEA, C. GRECU, VOICHIŢA HAŞ – Exprimarea fenotipică a acţiunilor genetice epistatice la porumb 95

M. MURARIU – Acţiuni genice determinante pentru reacţia porumbului la factori de intensivizare (fertilizare, desime) 109

V. E. MICU, E. C. PARTAS – Bifurcarea tulpinii la porumb – caracter ereditar 117

V. V. KOTERNIAK – Particularităţile eredităţii instabilităţii somatice a endospermului *opaque*$_2$ determinată de elementul reglator BG-3449 la porumb 125

I. BOZEŞAN – Date de producţie a unor clone de cartof obţinute prin tetraploidizare diplogametică ginoidă 131

LUCREŢIA POP, NATALIA R. MITROI – Aspecte de embriologie la hibridul interspecific *Solanum demissum* × *S. tuberosum* L. (II) 139

DORICA BOTAU, G. NEDELEA, AL. MOISUC – Influenţa condiţiilor *in vitro* asupra comportamentului citogenetic al unor genotipuri de sfeclă furajeră 153

MINODORA MEDI FRITEA – Studiul genetic al conţinutului de alcaloizi la lupinul alb (*Lupinus albus* L.) 157

Scanned with OKEN Scanner

GH. CHIRIAC, V. BUJOREANU – Contribuţii la elaborarea unor noi procedee de sporire a variabilităţii genetice la tomate 167
M. TUDOR – Posibilitatea obţinerii diploizilor materni prin hibridarea interspecifică *Solanum melongena* × *Solanum sodomaeum* 177
AURELIA IONESCU – Instabilitatea cariotipului la culturile de calus de *Solanum melongena* L. 183
AURELIA IONESCU – Evaluarea capacităţii androgenetice la dihaploizii de *Solanum melongena* L. 187
MIHAELA CORNEANU, G. C. CORNEANU – Studii citogenetice la specii de *Cactaceae* cultivate *in vivo* şi *in vitro* 193
M. COMAN – Unele rezultate privind consangvinizarea la căpşun (*Fragaria* × *Ananassa* Duch.) 201
MARIA RĂDULESCU, N. BRANIŞTE – Aspecte biochimice ale însuşirii de rezistenţă a mărului la rapăn 209
I. BOTU, ELENA TURCU, GH. ACHIM, M. BOTU – Cercetări privind variabilitatea unor caractere la descendenţii prunului Oteşani 8 215
M. A. PÂNTEA – Unele particularităţi embriologice ale autopolenizării nucului 223
GH. PÂRNUŢĂ – Unele caractere ale conurilor şi seminţelor obţinute din încrucişări dialele la molidul cu coroană îngustă şi cu coroană normală 231
MARGARETA IORDAN-COSTACHE, ALEXANDRINA PĂTRAŞCU-CĂLIN, AURELIA BREZEANU, CĂLINA-PETRUŢA CORNEA – Transfer de gene la genotipuri de plop (*Populus*) prin utilizarea de tulpini sălbatice şi modificate genetic de *Agrobacterium tumefaciens* 239
G. C. CORNEANU, MIHAELA CORNEANU, GH. F. BORLEA, I. BLADA, C. BĂDICA, C. FRANGOPOL – Mutageneza şi radiosensibilitatea la diferite populaţii de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii* (Duglas verde) 249
BRÂNDUŞA ELENA LIVESCU, IOANA NICOLAE – Translocaţia în tandem la vitele de rasă Bălţată cu Negru Românească 267
VIRGINIA MATEESCU, ILEANA MICU – Identificarea tipurilor şi frecvenţei variaţiilor euploide şi aneuploide la puii mutanţi transgenici „rumpless complet“ 275
ILEANA MICU, VIRGINIA MATEESCU – Tranziţii fizice ale ADN aviar în funcţie de specie şi gradul de mutageneză 283

Scanned with OKEN Scanner

RESEARCH OF VEGETAL AND ANIMAL GENETICS

Vol. IV

1996

CONTENTS

Preface 7

A. GH. JACOTA, N. I. BARBACARU, RODICA ENACHI – Molecular and genetical aspects of the response of plants to stress 9

C. V. ZANOAGA, CRISTINA PAUN, TATIANA BARLEANU – Redox-mediated cytogenetic aspects of biological pollution 19

I. DECUSEARA, A. GH. JACOTA – Modelling of the genetic regulation of the organisms to the over most favourable temperatures 27

IOANA HAGIMA, ELENA MARCELA BADEA, IRINA HOLOBIUC – The evaluation of the genetic diversity generated by *in vitro* culture in wheat (*Triticum aestivum*) using some molecular markers 35

A. GIURA, N. N. SAULESCU – Identification of chromosomes involved in controlling the large grain size of a wheat genotype 43

ALEXANDRINA MIHAILESCU, A. GIURA, AL. BUDE – Progress of haploid and doubled haploid production in winter barley 49

G. NEDELEA, DORICA BOTAU, A. PERES, AURUTA DIRLEA, E. MADOSA – Researches regarding genotype influence on regeneration capacity in *Avena sativa* 65

A. ROTARI, GALINA COMAROV, I. FRUNZE, M. LIVERA PARI – The identification of maize homozigote lines by genetic polimorphism of zein 71

NINA FRUNZE – Induction of pollen plantlets (*Zea mays* L.) 81

GALINA COMAROV, I. ANTIBOR, A ROTARI, N. CLIMENCO – Electrophoretic zein investigation concerning the somaclonal variation of maize 85

I. HAS, I. CABULEA, C. GRECU, VOICHITA HAS – Phenotypical expression of genetic epistatic effects in maize 95

M. MURARIU – Decisive genic activity for maize response to the intensification factors (fertilization, density) 109

V. E. MICU, E. C. PARTAS – Bifurcation of the maize stalk – a hereditary character 117

V. V. KOTERNIAK – Feactures of inheritance of the Opaque $_2$ endosperm somatic instability determined by the regulatory element BG-3449 in maize 125

I. BOZEŞAN – Production results of some potato clones obtained by diplogametic gynodioecious tetradiploidization 131

LUCRETIA POP, NATALIA R. MITROI – Embryologic aspects of interspecifics hybrid *Solanum demissum* × *S. tuberosum* L. (II) 139

DORICA BOTAU, G. NEDELEA, AL. MOISUC – The influence of *in vitro* conditions on cytogenetic behaviour of some fodder beet genotypes 153

MINODORA MEDI FRITEA – Genetic study of the alkaloids content in white lupine (*Lupinus albus* L.) 157

Scanned with OKEN Scanner

GH. CHIRIAC, V. BUJOREANU – Contributions to the elaboration of the new methods of genetic variability increase in tomatoes 167
M. TUDOR – Some possibilities of obtaining the maternal diploids by means of interspecific hybridization method between *Solanum melongena* × *Solanum sodomaeum* 177
AURELIA IONESCU – Instability of karyotype in callus cultures of *Solanum melongena* L. 183
AURELIA IONESCU – Evaluation of androgenetic ability of double haploid in *Solanum melongena* L. 187
MIHAELA CORNEANU, G. C. CORNEANU – Cytogenetics studies at some *Cactaceae* species at *in vivo* and *in vitro* cultures 193
M. COMAN – Some results on inbreeding in strawberry *(Fragaria* × *Ananassa* Duch.) 201
MARIA RADULESCU, N. BRANISTE – Biochemical aspects of resistance characteristics to scab, in the apple tree 209
I. BOTU, ELENA TURCU, GH. ACHIM, M. BOTU – Investigations on characters variability of some progenies of Oteşani 8 plum variety, employed to obtain new rootstocks 215
M. A. PANTEA – Some embryologic characteristics of walnut selfpollination 223
GH. PARNUTA – Some characters of the cones and seeds obtained by diallel crosses in the narrow and normal – crowned norway spruce 231
MARGARETA IORDAN-COSTACHE, ALEXANDRINA PATRASCU-CALIN, AURELIA BREZEANU, CALINA-PETRUTA CORNEA – Genes transfer in Populus using wild and genetic modified strains of *Agrobacterium tumefaciens* 239
G. C. CORNEANU, MIHAELA CORNEANU, GH. F. BORLEA, I. BLADA, C. BADICA, C. FRANGOPOL – Mutagenesis and radiosensitivity at different populations of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. menziesii (Douglas-fir) 249
BRANDUSA ELENA LIVESCU, IOANA NICOLAE – Tandem translocation in Romanian Black Spotted breed of cattle 267
VIRGINIA MATEESCU, ILEANA MICU – Type and frequency identification of euploid and aneuploid variations of „completely rumpless" transgenic mutant chicks 275
ILEANA MICU, VIRGINIA MATEESCU – Physical transitions of the avian DNA as a function of the species and the mutagenesses level 283

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Conținutul celui de al IV-lea volum de cercetări originale de genetică vegetală și animală este alcătuit din lucrările susținute public la cel de al XVIII-lea SIMPOZION NAȚIONAL DE GENETICĂ VEGETALĂ ȘI ANIMALĂ, care a avut loc la Timișoara, în zilele de 13, 14 și 15 iunie 1994.

Acest simpozion, organizat de Institutul de Cercetări pentru Cereale și Plante Tehnice de la FUNDULEA, în colaborare cu Universitatea de Științe Agricole a Banatului și cu Stațiunea de Cercetări Agricole Lovrin, a reunit 140 de specialiști, dintre care 20 din Republica Moldova.

Programul celui de al XVIII-lea SIMPOZION NAȚIONAL DE GENETICĂ VEGETALĂ ȘI ANIMALĂ a cuprins 28 de referate susținute public și 39 de postere. Dintre acestea, au fost selectate pentru volumul IV numai 33 lucrări considerate mai reprezentative pentru nivelul actual de dezvoltare a cercetărilor de genetică din țara noastră și din Republica Moldova.

Lucrările pe care le prezentăm în volumul al IV-lea aparțin mai multor domenii de activitate, și anume: trei au un caracter general, teoretic, 15 se referă la cereale, plante tehnice și furajere, 5 au ca obiect plante legumicole, 4 – pomii fructiferi, 3 – esențe lemnoase și 3 aparțin sectorului zootehnic.

Împărțirea lucrărilor pe domenii are un caracter aleatoriu și este datorată în primul rând autorilor care au înțeles să prezinte manuscrisul în termenul stabilit.

Ca și cele trei volume anterioare, volumul al IV-lea cuprinde un număr foarte redus de lucrări din domeniul geneticii animale, fapt regretabil.

Scanned with OKEN Scanner

Un loc de frunte în acest volum îl ocupă lucrările cu caracter teoretic prezentate de specialiştii din Republica Moldova – A. Gh. Jacotă, I. Decuseară, V. E. Micu şi alţii.

Ne exprimăm speranţa că al IV-lea volum din CERCETĂRI DE GENETICĂ VEGETALĂ ŞI ANIMALĂ va fi primit cu interes de specialiştii români şi de colegii lor din Republica Moldova. Mai avem de parcurs un drum lung până la afirmarea şcolii româneşti de genetică vegetală şi animală, iar volumul IV constituie o etapă, care, sperăm, va stimula acest gen de cercetări

Prof. dr. doc. **Alexandru Viorel Vrânceanu**

Scanned with OKEN Scanner

ASPECTE MOLECULAR-GENETICE ALE REACȚIEI PLANTELOR LA STRESUL TERMIC

A. GH. JACOTĂ, N. I. BĂRBĂCARU, RODICA ENACHI*

Rezistența la condițiile nefavorabile de mediu reprezintă un factor priomordial în determinarea arealului de răspândire și a nivelului de productivitate al plantelor. De cele mai multe ori este imposibilă evitarea acestor factori, existând însă posibilitatea diminuării efectului nefavorabil. Cunoașterea mecanismelor de acțiune a factorilor stresanți și a reacțiilor dc adaptarc ale plantelor, care asigură unor genotipuri capacitatea de a suporta stresul, reprezintă un element deosebit de important în acest domeniu.

Un progres esențial în studiul stresului și mecanismelor de adaptare ale plantelor la factorii nefavorabili a fost realizat de cercetările efectuate de Alexandrov (1985); Hochochka și Somero (1985).

În ultimii ani au fost efectuate studii în vederea evidențierii aspectelor moleculare ale stresului, precum și a descoperirii unor reacții universale și conservative la șocul termic al tuturor organismelor vii (Chimpel, Key, 1985; Nover, Scharf, Neuman, 1989; Neuman et al., 1989). Etapa actuală în studiul stresului se caracterizează prin cercetarea corelației existente între gradul de rezistență a organismelor la diferiți factori nefavorabili și caracteristicile preoteinelor de stres (PS), mARN și cADN a genelor care se exprimă specific pe parcursul acțiunii acestuia (Krimpamoy și colab., 1991; Jacota, 1992; Korisson și colab., 1993).

Stresul termic și cel hidric sunt factori restrictivi de primă importanță în răspândirea și productivitaea plantelor.

Ca rezultat al acțiunii timp de 15-20 minute a temperaturilor stresante, în organele plantelor apar o serie de componenți proteici cu o vastă diversitate de masă moleculară și sarcină electrică.

Aceste proteine sunt componente induse de stres care, în condiții normale, lipsesc sau sunt nedetectabile existând în cantități infime (Voinikov, 1989; Kosakovskaia, 1988).

Inducția proteinelor de stres (PS) este reglată mai ales la nivel transcripțional, deși este posibilă și prezența unei informații deja transcrisă,

*Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova

rezervată (Findly, Peterson, 1981; Schofle şi colab., 1986). Poteinele de stres sunt substanţe tranzitorii, deoarece după un anumit timp de acţiune a factorului stresant ele dispar diferenţiat, iar mARN specifici sunt descompuşi.După îndepărtarea factorului de stres, în plante se restabileşte sinteza proteinelor preexistente şi acest proces este reglat preponderent la nivel de translaţie, deoarece mARN caracteristic condiţiilor normale se conservă.

La plantele superioare sunt depistate trei grupe diferite de proteine de stres cu masa moleculară mare: 68-104 kD (dar şi mai mare); masă moleculară medie: 20-33 kD; masă moleculară mică: 15-18 kD (dar şi mai mică) (Kosakovskaia, 1988; Alexandrov, Kisliuk, 1994). Dacă prima grupă este prezentă în toate organismele, ultima este caracteristică doar pentru plante. Proteinele de stres sunt codificate atât de familii de gene nucleare, cât şi de citoplasmice. Cercetările efectuate la diferite specii de plante au demonstrat prezenţa proteinelor de stres în nucleu, nucleoli, mitocondrii, plastide şi ribozomi.

Astfel, în cloroplaste, sub acţiunea şocului termic apar circa 18 proteine de stres de masă moleculară mare şi mică, localizate în stromă şi grane. Majoritatea din ele sunt sintetizate în citoplasmă şi apoi transferate în cloroplaste (Kuchina, Miculovici şi Kulaeva, 1988).

La şocul hipotermic, cu temperaturi cuprinse între 0 şi 15°C, are loc o inducţie a sintezei proteinei de stres şi care , de asemenea, se caracterizează printr-un polimorfism evident (Voinikov şi colab., 1986; Voinikov şi Coratov, 1991; Jacotă, 1992).

Se constată că, deşi sunt componenţi comuni pentru stresul temperaturilor înalte şi joase, proteinele de stres induse de hipotermie sunt de altă natură.

Există date care afirmă rolul protector al proteinelor de stres la acţiunea factorilor stresanţi. Funcţiile lor sunt de natură enzimatică şi regulatoare (Alexandrov şi Kisliuk, 1994).

S-a stabilit, la diferite specii, că preexpunerea lor în condiţii de stres moderat determină sporirea termotoleranţei şi supravieţuirea lor la stresul subletal sau letal (Kosakovskaia, 1988; Alexandrov şi Kisliuk, 1994).

Extragerea unor clone de cADN al genelor ce codifică în condiţii de stres termic sinteza unor transcripţii specifice, deschide perspective reale în vederea identificării genelor de rezistenţă a plantelor la frig, arşiţă şi îngheţ (Kripamoy şi colab., 1991), prin aceasta devenind posibilă obţinerea de forme de plante rezistente la stres, cu productivitate mare, prin metode de inginerie genetică.

Scopul prezentei lucrări constă în elucidarea unor aspecte molecular-genetice insuficient studiate ale efectului stresului termic asupra plantelor, studiul relaţiei dintre gradul de rezistenţă al genotipurilor şi nivelul de expresie al genelor, caracterizat prin nivelul de sinteză al diferitelor clase de mARN şi al proteinelor de stres.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Cercetările au fost efectuate pe genotipuri de tomate şi porumb, cu grad diferit de rezistenţă la temperaturi ridicate şi scăzute.

Scanned with OKEN Scanner

Nivelul transcripţiei genelor proteinelor şocului temperaturilor ridicate a fost studiat la plante de tomate din soiurile Nistru (cu rezistenţă mare la arşiţă), Gloria şi Fachel (cu rezistenţă medie la arşiţă).

Acţiunea şocului termic a fost exercitată funcţie de intensitate şi durată, conform schemei:

- *varianta A* – temperatura (t°) 25°C (martor);
- *varianta B* – majorare lentă a temperaturilor: 25°C $\xrightarrow{30'}$ 28°C $\xrightarrow{30'}$ 32°C $\xrightarrow{30'}$ 36°C $\xrightarrow{30'}$ 38°C $\xrightarrow{30'}$ a. 40°C 120'; b. 40°C $\xrightarrow{30'}$ 42°C 120'; c. 40°C $\xrightarrow{30'}$ 44°C 120'; d. 40°C $\xrightarrow{30'}$ 46°C 120';
- *varianta C* – majorarea bruscă a temperaturii: a. 25°C → 42°C 120'; b. 25°C →44°C 120'; c. 25°C → 46°C 120'.

Extragerea ARN total, separarea poli $(A)^+$ARN, analiza electroforetică a ARN, sinteza cADN pe bază de poli $(A)^+$ARN prin reacţia revertranscripţiei şi hibridarea cADN (^{32}P) cu poli $(A)^+$ARN, imobilizat pe filtre de nylon, au fost efectuate conform metodei publicate anterior (Bărbăcaru, 1992).

Sinteza proteinei de stres a fost studiată în frunzele şi rădăcinile de porumb în două faze ale ontogenezei: în faza juvenilă (la trei frunze) şi la începutul înfloririi. S-au folosit liniile 23/78 B, F 7, DA 3 (rezistente la frig şi arşiţă), A 111 şi 346 (mediu- rezistente la frig şi arşiţă) şi hibrizii F_1 dintre ele. Marcarea radioactivă a proteinelor *in vivo* la plantele studiate s-a efectuat prin incubarea probelor în soluţie de ^{35}S metionină (Key, Lin, Chen, 1981). Electroforeza unidimensională a polipeptidelor în gel de poliacrilamidă (SDS) a fost efectuată conform metodei descrise de Leamli (1970), iar cea bidimensională - conform protocolului elaborat de O'Farrell (1975). În prima direcţie, separarea proteinelor a fost efectuată conform punctului izoelectric pHi în intervalul pH 3,5-10,0, iar în a doua - conform masei moleculare în gel SDS - poliacrilamidă de 15%. Fluorografia şi vizualizarea gelurilor au fost executate cu ajutorul peliculelor Roentgen de tipul "PM-B" (Bonner şi Laskey 1984).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Se ştie că stresul termic determină în plante o sinteză *de novo* de mARN. În acelaşi timp, practic, este stopată sinteza mARN-ului, caracteristică pentru condiţiile normale de degradarea sau stocarea fondului preexistent în celule (Kosakovskaia, 1988).

Obţinerea de poli $(A)^+$ARN din plantele supuse arşiţei a permis sinteza cADN (^{32}P), care a servit ca instrument eficace pentru analiza transcripţiilor acumulate în celule pe parcursul stresului termic. Probele de cADN (^{32}P) sintetizate pentru fiecare variantă a experienţei au fost folosite ca sonde de hibridare, pentru evidenţierea mARN al genelor şocului termic. Pentru aceasta, poli $(A)^+$ARN, extras din plantulele supuse la diferite temperaturi ridicate, a fost transferat pe filtre de nylon şi hibridat cu cADN marcat.

Prin rezultatele obţinute s-a stabilit că o activitate transcripţională maximă a genelor la şocul temic s-a realizat la temperatura de 42°C timp de 2 ore (varianta B).

Scanned with OKEN Scanner

La creşterea lentă a temperaturii până la 46°C transcrierea acestor gene, practic, a încetat (fig. 1, coloana 2), cu excepţia mARN cu masa ^{16}S.

Probabil că acest transcript a fost sintetizat foarte activ la temperatura de 42°C, iar la creşterea temperaturii până la 46°C – a fost supus degradării mult mai lent dacât ceilalţi componenţi.

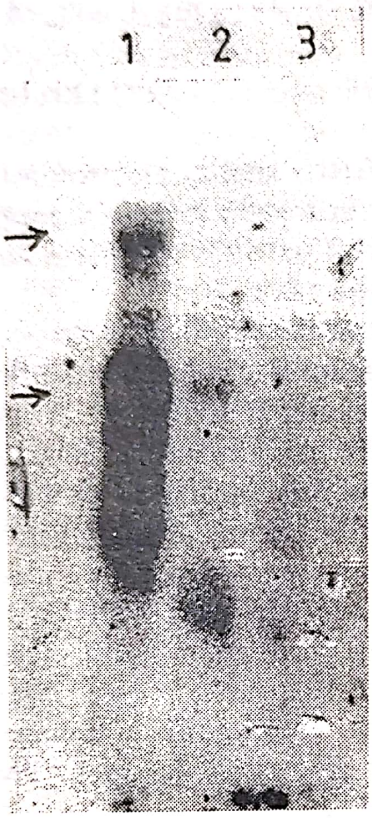


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 1 – Hibridarea poli (A)⁺ ARN, extras din plantulele de tomate în varianta martor (varianta A), şi după stresul termic de 42°C şi 46°C (varianta B) cu cADN marcat: 1 – Poli (A)⁺ARN extras din plantule după acţiunea stresului termic de 42°C (120 min., varianta B); 2 – Poli (A)⁺ARN extras din plantule după acţiunea stresului termic de 46°C (120 min., varianta B); 3 – Poli (A)⁺ARN, extras din plantulele martor (varianta A). (RNA poly (A)⁺ hybridization, extracted from tomatoes seedlings in control varianrt, variant (A) and after heat shock at 42°C and 46°C (variant B) with marked cADN: 1 – RNA poly (A)⁺ extracted from seedlings after heat shock at 42°C (120 min., variant B); 2 – RNA poly (A)⁺ extracted after heat shock at 46°C (120 min., variant B); 3 – RNA poly (A)⁺ extracted from control seedlings (variant A)

Fig. 2 – Hibridarea poli (A)⁺ extras din plantulele de tomate după acţiunea stresului termic: 40°C (varianta B) cu cADN marcat: 1, 2 – poli (A)⁺ARN, extras din plantulele de tomate soiul Gloria după acţiunea stresului termic de 40°C (1) şi 42°C (2); 3 – poli (A)⁺ARN extras din cultura de celule după stresul termic de 40°C (120 min.); 4, 5 – poli (A)⁺ARN extras din plantulele de tomate soiul Nistru după stresul termic de 40°C (4) şi 42°C (5); 6, 7 – poli (A)⁺ARN extras din plantulele de tomate soiul Fachel după stresul termic de 40°C (6) şi 42°C (7). (RNA poly (A)⁺ hybridization extracted from tomatoes seedlings after heat shock at 40°C, 42°C (var. B) with marked cADN): 1, 2 RNA poly (A)⁺ extracted from tomatoes seedlings of Gloria cultivar after heat shock at 40°C (1) and 42°C (2); 3 – RNA poly (A)⁺ extracted from cells cultivar after heat shock at 40°C (120 min.); 4, 5 – RNA poly (A)⁺ extracted from tomatoes seedlings of Nistru cultivar after heat shock at 40°C (4) and 42°C (5); 6, 7 – RNA (A)⁺ extracted from tomatoes seedlings of Fachel cultivar heat shock at 40°C (6) and 42°C (7)

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 3 – Hibridarea poli (A)⁺ARN, extras din plantulele de tomate după acţiunea bruscă a stresului termic de 42°C şi 44°C (varianta C) cu cADN marcat: 1, 2 – poli (A)⁺ARN a soiului Gloria, 1–44°C, (2) 42°C; 3 – poli (A)⁺ARN din cultura de celule (42°C); 4, 5 – poli (A)⁺ARN a soiului Nistru. 42°C (4); 44°C (5); 6, 7 – poli (A)⁺ARN, soiul Fachel. 42°C (6); 44°C (7). (RNA poly (A)⁺ hybridization, extracted from tomatoes seedlings after quick action of heat shock at 42°C and 44°C (var. C) with marked cRN: 1, 2 – RNa poly (A)⁺ of Gloria cultivar. 44°C (1); 42°C (2); 3 – RNA poly (A)⁺ from cells culture (42°C); 4, 5 – RNA poly (A)⁺ of Nistru cultivar. 42°C (4); 44°C (5); 6, 7 – RNA poly (A)⁺ of Fachel cultivar. 42°C (6); 44°C (7)

În etapa următoare a cercetărilor a fost efectuată o analiză comparativă a hibridării poli (A)⁺ARN, extras din plantulele celor trei soiuri supuse stresului termic potrivit variantelor B şi C. În calitate de martor pentru hibridare a fost utilizat cADN marcat, obţinut din plantule supuse stresului termic timp de 2 ore. Rezultatele hibridării şi autoradiografiei au demonstrat că sinteza mARN-ului genelor şocului termic se manifestă cel mai intens la soiurile Nistru şi Gloria. La soiul Fachel, sinteza maximă a mARN-ului de stres a fost realizată la 40°C, iar creşterea temperaturii cu numai 2°C a determinat o degradare rapidă a mARN-ului (fig. 2, varianta B). Datele obţinute atestă, de asemenea, că după o incubare de două ore la temperaturile de 40°C şi 42°C la toate cele trei soiuri a fost sintetizat mARN de stres de acelaşi tip, însă în cantităţi relativ diferite.

Prin creşterea temperaturii mediului până la 44° şi 46°C (varianta B), s-a observat o degradare totală a transcripţiilor cu masă moleculară mare. În aceleaşi condiţii, transcriptul cu masa 16 a fost la fel de stabil, îndeosebi la soiurile Nistru şi Gloria. Se poate presupune că acest component programează sinteza unei proteine de mare importanţă pentru rezistenţa celulelor la stresul temic de durată prelungită.

La creşterea rapidă a temperaturii mediului de la optim la valoare de şoc (varianta C), s-a stabilit că nivelul de biosinteză al ARN-ului de stres a fost net inferior, în comparaţie cu experienţele în care creşterea temperaturii a fost lentă (fig. 3).

La acţiunea bruscă a stresului termic, reacţia diferitelor soiuri a fost specifică. Astfel, s-a remarcat soiul Nistru, printr-o sinteză abundentă de ARN de stres, îndeosebi matricele de masă moleculară ^{16}S şi ^{25}S.

La soiurile Gloria şi Fachel, la temperatura de 44°C, sinteza ARN-ului de stres, practic, a fot stopată (fig. 3, coloanele 1, 7).

Acţiunea temperaturilor ridicate asupra plantelor de tomate determină activarea genelor şocului termic în funcţie de intensitate, durata acţiunii şi viteza de creştere a temperaturii. S-a demonstrat că la creşterea lentă a temperaturii celula

Scanned with OKEN Scanner

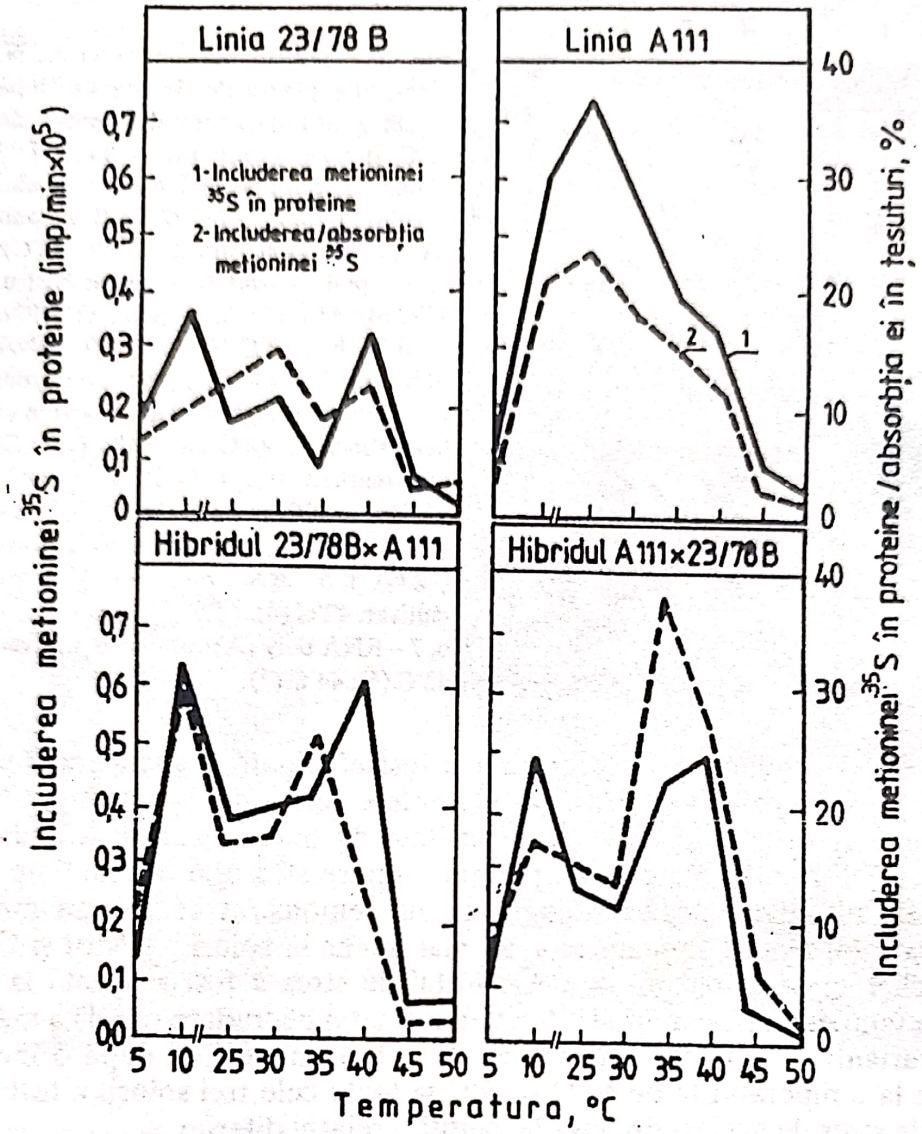


Fig. 4 – Inducţia biosintezei totale a proteinelor de stres în frunzele liniilor 23/78 B; A 111 şi ale hibrizilor F_1 reciproci 23/78 B × A 11; A 111 × 23/78 B de către temperaturile supra- şi suboptime (faza de trei frunze).
(Induction of the total biosynthesis of stress proteins in leaves of lines 23/78 B; A 11 and reciprocal hybrids F_1 23/78 B × A 111; A 111 × 23/78 B by hyper and hypothermic shocks; three leaves stage)

vegetală se adaptează mai rapid şi eficace la condiţiile de stres şi că genele stresului termic posedă diferite "praguri" de activare. Este posibil ca proteinele de stres sintetizate la temperaturi substresante să îndeplinească funcţii importante de protecţie a metabolismului celular (Schofle şi colab., 1986).

Nu este exclus faptul ca aceste proteine să mărească la plante stabilitatea mARN de stres, sintetizat în celule la temperaturi ridicate stresante. Astfel de rezultate au fost demonstrate în cercetările cu Drosophila (Lozovskaia şi Evgheniev, 1984). Inhibţia procesului de translaţie a proteinelor menţionate rezultă direct în scăderea stabilităţii mARN stresului termic (Findly şi

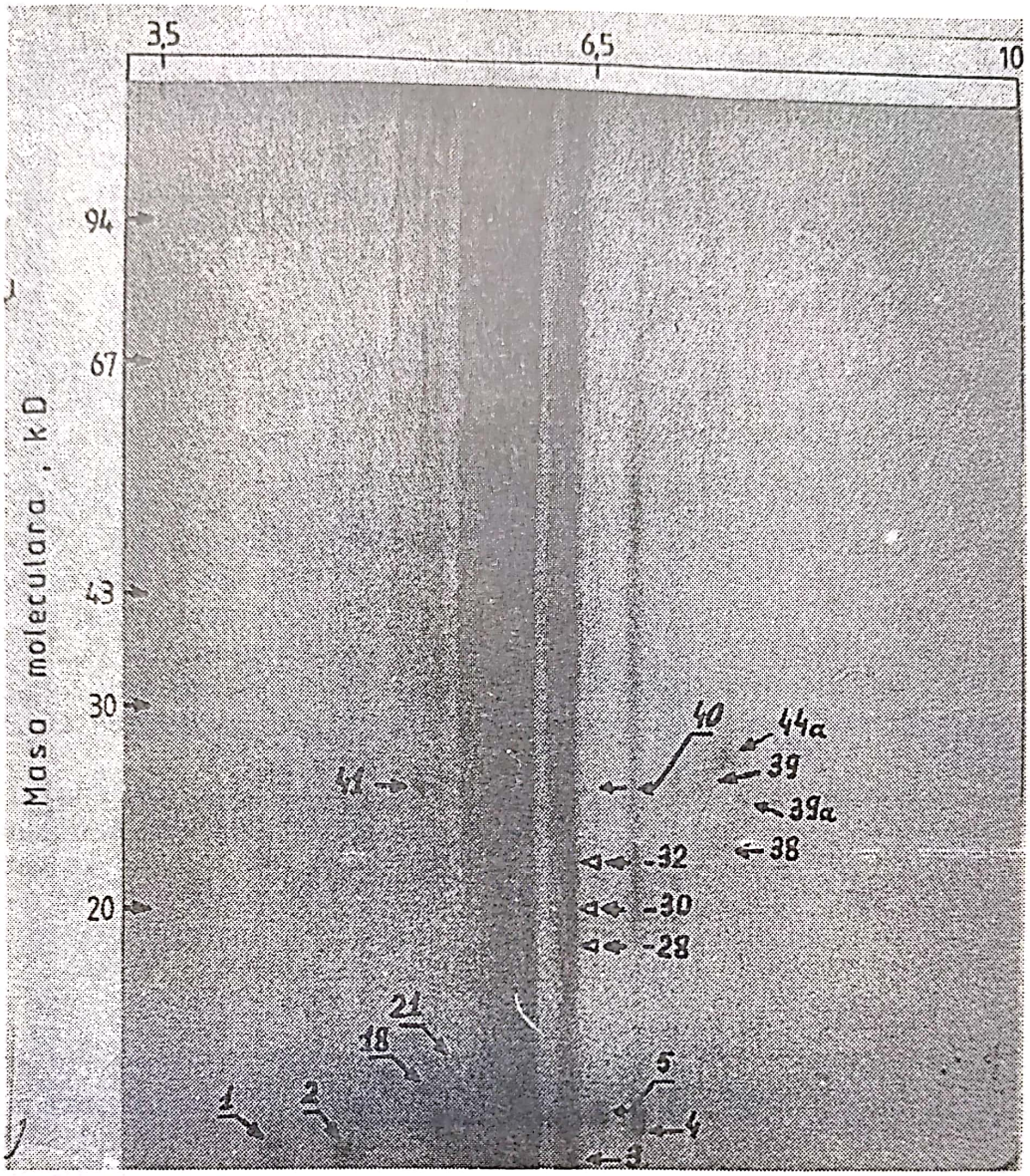


Fig. 5 – Sinteza proteinelor de stres sintetizate în frunzele liniei de porumb 346 la acţiunea temperaturii de +35°C
(Synthesis of the stress proteins synthetized in maize leaves of line 346 under heat shock +35°C)

Peterson, 1981). Este evidentă corelaţia dinte rezistenţa sporită la arşiţă a plantelor soiului Nistru, nivelul de sinteză şi stabilitatea sintezei ARN-ului la acţiunea şocului termic.

Studiul nivelului de sinteză în intervalul de temperaturi cuprinse între +5° şi +50°C a reliefat o comportare diferită a genotipurilor de porumb studiate. Astfel liniile A111 şi 346 (în fază trei frunze), cu un grad mediu de rezistenţă la arşiţă, se caracterizează printr-un singur maxim de activitate a biosintezei proteinelor marcate preponderent în zona temperaturilor scăzute, suboptime. La temperaturi ridicate (35–40–45°C), capacitatea de sinteză a proteinelor de stres a acestor genotipuri a fost esenţial diminuată (fig. 4). Un singur maxim a fost caracteristic şi la liniile DA 3 şi F 7. Linia 23/78 B, precum şi hibrizii F_1 cu această linie s-au

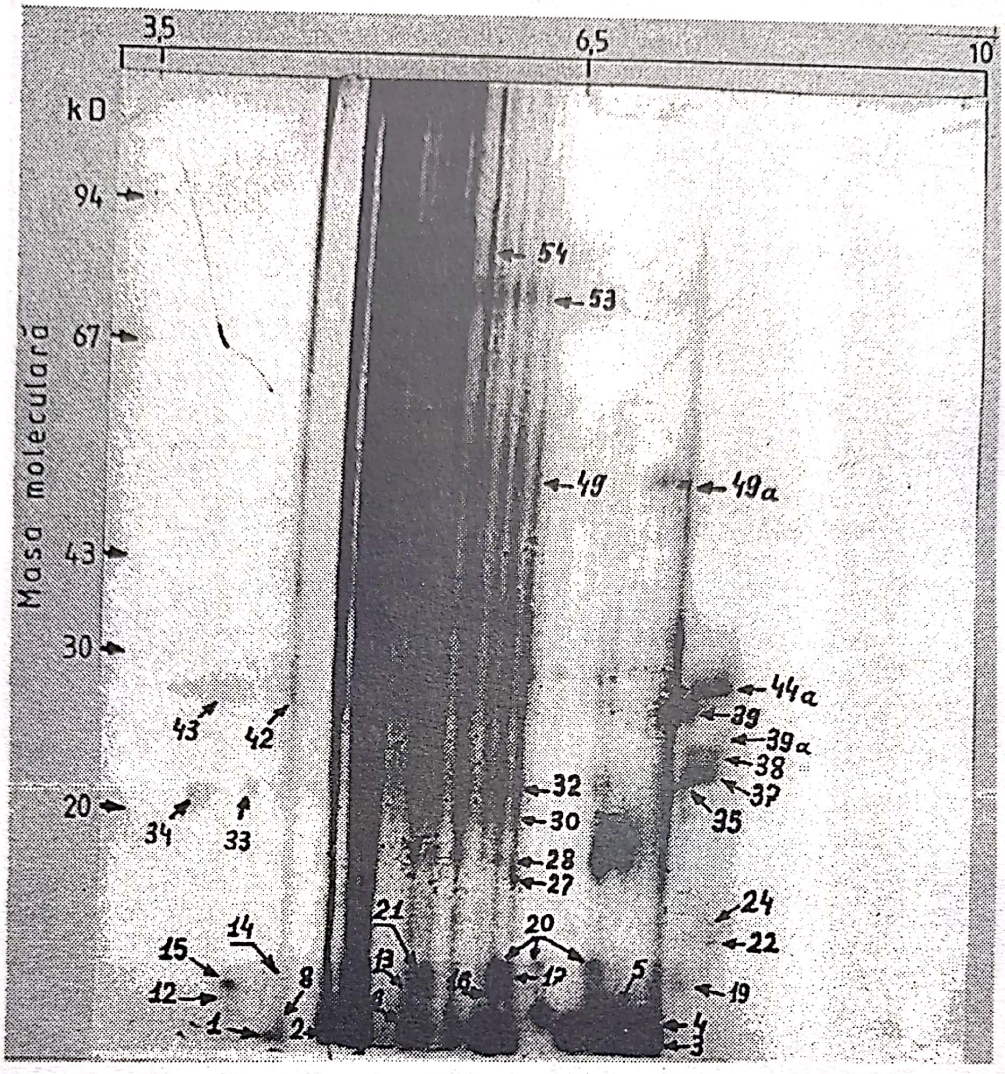


Fig. 6 – Sinteza proteinelor de stres sintetizate în frunzele liniei de porumb A 111 la acţiunea temperaturii de +35°C (Synthesis of the stress proteins synthetized in maize leaves of line A 111 under heat shock +35°C)

evidenţiat prin două maxime de activitate în sinteza proteinelor de stres: unul – în zona temperaturilor pozitive scăzute (+10 – +12°C) şi un al doilea – în zona temperaturilor ridicate (+40–45°C).

Pe baza cunoaşterii particularităţilor sintezei proteinelor de stres ale formelor parentale pot fi creaţi hibrizi F_1 cu capacitate de adaptare mărită.

A fost stabilit, de asemenea, că nivelul de sinteză a proteinei de stres în diferite organe ale plantelor de porumb este diferit. Astfel, nivelul de includere a aminoacidului marcat în proteinele rădăcinilor este de 3–4 ori mai mare decât în frunze în aceeaşi fază a ontogenezei.

Reacţia genotipurilor la stres a fost specifică, deosebindu-se atât după intensitatea sintezei totale a proteinelor, cât şi după spectrul de proteine (polipeptide) de stres sintetizate la o temperatură concretă. Astfel, la temperatura

de 35°C nivelul includerii metioninei ^{35}S în polipeptidele liniei A 111 a atins cota 2,45 x 10^3 imp/min, iar la linia 346 – numai 1,07 x 10^3 imp/min. Spectrul proteinelor de stres sintetizate în ţesuturile frunzelor liniei A 111 a fost, de asemenea, mai mare decât cel din ţesuturile frunzelor liniei 346 (fig. 5, fig. 6).

Sub acţiunea temperaturii de 35°C, în frunzele liniei A 111 – linie care se caracterizează printr-o adaptare dinamică la stres la nivel de organism - a fost indusă sinteza polipeptidelor cu masa moleculară 11,0 kD pHi (4,5; 4,8; 5,3) 12,0 kD pHi 6,3; 12,5 kD pHi (4,5; 4,8; 5,7; 6,4); 13,2 kD pHi (5,3; 6,4; 7,2) 14,0 kD pHi (5,7; 6,18–6, 6–3 fracţii) 15,6 kD pHi 7,5; 17,0 kD pHi 6,6; 21,4 kD pHi (4,5; 3,8); 24,2 kD pHi 7,1; 25,1 kD pHi 7,3; 26,2 kD pHi (4,8; 3,8); 34,2 kD pHi (5,3–7,1; 15 fracţii); 42,2 kD pHi (5,3–7,1, 15 fracţii) şi cu masa moleculară mare: 69,9–73,2 kD pHi (5,3–7,06, 15 fracţii) 81,5–79,4 kD pHi (5,3–7,06, 15 fracţii). În frunzele liniei 346 se manifestă o adaptare lentă la stres la nivel de organism, spectrul proteinelor a fost mai mic şi reprezentat prin polipeptidele cu masă moleculară 13,18 kD pHi (6,4;5,3); 23,0 kD pHi 7,5; 24,2 kD pHi 7,1; 25,1 kD pHi 7,3; 28,8 kD pHi 7,5; 36,4 kD pHi (5,9–6,6, 6 fracţii); 38,7 kD pHi (5,9–6,6, 6 fracţii); 61,3 kD pHi (5,6–6,6, 8 fracţii); 67,0–75,0 kD pHi (5,9–6,6, 8 fracţii); 75,6–78,0 kD pHi (5,9–6,6, 8 fracţii).Deoarece majoritatea proteinelor de stres sintetizate în frunzele acestor genotipuri au aceeaşi greutate moleculară, sau se deosebesc după masa molecuară în limitele erorii metodei folosite (±400 D),a fost efectuată o numerotaţie unică. Grupele de polipeptide de stres cu o sinteză evidentă sunt prezentate în figurile 5 şi 6.

La acţiunea unor temperaturi mai mari (+40°C) s-au sintetizat majoritatea proteinelor de stres sintetizate şi la temperatura de +35°C, intensitatea sintezei lor fiind mai mare.

Astfel, cu o intensitate mai mare, în frunzele liniei A 111 au fost sintetizate următoarele polipeptide: 12,5 kD pHi (4,5; 4,8) 15,6 kD pHi 7,5; 21,4 kD pHi 3,8; 69,9–73,2 kD pHi (5,9-6,6); 85,1-79,4 kD pHi (5,3–7,06). Totodată, temperatura de 40°C a determinat inhibarea sintezei unor proteine de stres induse la temperatura +35°C. Este vorba de polipeptidele cu masa moleculară 12,5 kD pHi 6,4; 13,2kD pHi 6,4; 17,0 kD pHi 6,6; 24,2 kD pHi 7,1; 25,1 kD pHi 7,3. A scăzut şi intensitatea sintezei unor polipeptide "normale", şi anume a celor cu masa moleculară 29 kD pHi (5,3–7,0); 56,2 kD pHi (6,18–7,1); 61,6 kD pHi (5,3-6,6) şi 67 kD pHi (5,4–7,1).

În acelaşi timp, temperatura de +40°C a indus sinteza unor proteine de stres noi, care la temperatura de +35°C nu au fost sintetizate. Este vorba de polipeptidele: 13,2 kD pHi 5,3; 15,1 kD pHi (6,18–6,6, 3 fracţii); 15,6 kD pHi (6,18–6,6, 3 fracţii); 15,6 kD pHi 5,25; 18,0 kD pHi (5,7–7,1, 9 fracţii); 20,4kD pHi (6,4–7,0, 4 fracţii); 26,2 kD pHi 5,2; 37,1 kD pHi (6,18–7,1, 8 fracţii); 51,3 kD pHi (5,3–7,0,14 fracţii); 64,5 kD pHi (5,3–6,6, 12 fracţii); 89,1–94 kD pHi (5,3–6,6, 12 fracţii).

Spre deosebire de linia A 111, linia 346 a reacţionat la temperatura de +40°C prin sinteza a numai trei grupe noi de proteine de stres, care nu au fost sintetizate la +35°C: grupul de polipeptide cu punctele izoelectrice cuprinse între 5,7 şi 7,1; polipeptide cu masa moleculară mare 89,0-94 kD au fost reprezentate de 14 fracţii în limitele punctelor izoelectrice 5,3–6,6 şi 45,3 kD pHi 7,5. La fel ca şi la linia A 111 s-a intensificat sinteza polipeptidelor cu masa moleculară mică (10,5–13,18) în frunzele liniei 346.

Ar fi nejustificată presupunerea că lărgirea spectrului de polipeptide cu masă moleculară mică ar indica o dezagregare a polipeptidelor cu masă moleculară mare, deoarece intensificarea sintezei proteinelor cu masă moleculară mică la acţiunea temperaturilor supraoptime (+35°C, +40°C) are loc concomitent cu intensificarea sintezei polipeptidelor cu masă moleculară mare.

Scanned with OKEN Scanner

Considerăm că genotipurile cu rezistenţă sporită la temperaturi extreme posedă un nivel înalt de sinteză a transcripţiilor specifice şi a proteinelor de stres respective şi un polimorfism mai variat de proteine de stres cu longevitate mărită.

MOLECULAR AND GENETICAL ASPECTS OF THE RESPONSE OF PLANTS TO STRESS

SUMMARY

The paper presents some results obtained in Institute for genetics of Moldavian Sciences Academy, concerning the response of the plant genome to abiotical stress (hypo-and hyperthermi osmotic,hydric). It was studied, depending on genotype and time, the influence of some stress factors with different level of severity on the plant genome (in maize, tomatoes, soybean) synthesis level, composition of RNAm and stress proteins. It has been established the mechanisms which are allowed to argue and improve present conception in conection with implication of integrated complex of specific and nonspecific reactions in generalized response of plants to stress factors.The reaction to stress at the different genotypes and under the action of the different factors had various degrees and reactivity level, longevity of the different molecular components RNAm and stress proteins, preponderant or exclusive synthesis of some RNAm fractions and stress proteins. A very important objective should be the creation of some specialized collection of molecular markers for fundamental researches and screening of genotipes with the important genes bloks for improvement of stability.

BIBLIOGRAFIE

Alexandrov V. A., 1985 – Reaktivnosti kletok i belki.Ed. Nauka, Moskva: 317.

Alexandrov V.I.A., Visliuk I., 1994 – Reakţia na teplovoi şok: fiziologhiceskii aspekt. Titologhia, Moskva, 36, 1: 5-59.

Bărbăcaru N.I., 1992– Molekulearnâi analiz transkripţii matrichnân RN pri teplovom stresse u tomatov. Bul. A.S.a Republicii Moldova Şt. biol. şi chim.:29–38.

Findly R.C., PetersonT., 1981 – Regulated tanscription of genes for action and heat shock proteins in culture *Drosophyla melanogaster.* I.Cell Biol., 88: 323–328.

Hochachka P., Somero Dj., 1988 – Biochimiceskaia adaptaţia Moskva, Mir.: 568.

Jacotă A., 1992 – Fiziologo- gheneticeskie aspectî ustoicivosti k abioticeskim stressam C_3 i C_4 rastenii s razlicinâm potenţialom productivnosti. Dis. doctor. hab. în ştiinţe biologice, Chişinău.

Karisson B. et al., 1993 – Ekspressia termoustoicivosti polipeptidov 5 vidov kartofelea, razlichnâh po morozoustoicivosti i sposobnosti k akklimatizaţii. Plant. Physiol., 102, 1:84.

Kosakovskaia I.V., 1988 – Belki pri stressah. Fiziol. i biochimia kult. rast., 20,2: 107–117.

Kimpel I.A., Kei I.L., 1985 – Trends Biochem. Sci., 10, 9:353.

Kripamoy A., Kazuyki S., Nobuhiro S., Tomonobu K., 1991 – Plant and Cell Physiol., 32, 8:1285–1289.

Kuchina I.M., Mikulovici T.P., KulaevaO.N., 1988 – Belki teplovogo şoka nahodiaşciesea v hloroplastah, kodiruiemâe iadernâmi i hloropastnâmi ghenami. Docl. A.N.SSSR, 301: 509-511.

Lozovskaia E.R., Evgheniev M.B.,1984 - Teplovoi şok u drosofilî i regulaţia aktinovsti ghenoma. Viniti Itogi nauki i tehniki. Mol. biol., Moskva, 20:125-185.

Neumann D., Nover L., Parthier B., Reiger R., Schorf K.D., 1989 – Bio. Zbl., 108:1.

Nover L., Scharf R.D., Neumann D., 1989 - Mol. and Cell Biol., 9,3:1298.

Schofle F., Baumann G., Raschke E., Beran A., 1986 – The expression of heat shock genes in higher plants Phill. Trans. R. Soc. London, 314:453–468.

Voinikov V.K., Koratov M.V., 1991 – Nizkotemperaturnaia indukţia sinteza belkov holodovogo şoka prorostkov linii i ghibridov kukurzî. Titol. i Ghenetika, Kiev, 25, 6:64–69.

Voinikov V.K.,Ivanova G., Koratov M., 1986 – Sintez belkov v rastenii pri deistvii nizkoi temperaturî. Fiziol. i biochim. kult. rast., Kiev, 18:211–222.

Voinikov V.K., 1989 – Stressovâe beki rastenii pri deistvii vâsokoi i nizkoi temperaturî. Stressovâe belki rastenii. Novosibirsk, Nauka: 5–20.

Scanned with OKEN Scanner

ASPECTE CITOGENETICE MEDIATE REDOX, ALE POLUĂRII BIOLOGICE

C. V. ZĂNOAGĂ, CRISTINA PĂUN, TATIANA BÂRLEANU*

Fenomenul de poluare, ca o manifestare a depăşirii domeniului normal al parametrilor ce caracterizează mediul, poate fi discutat în funcţie de oricare din factorii ce concură la acea depăşire, fie ei factori fizici, chimici ori biologici. În cele ce urmează, vom face referire la factorii biologici, la modificările pe care dezvoltarea unui organism oarecare le provoacă în mediu, modificări ce pot fi nocive pentru alte organisme, şi anume, fenomenul de alelopatie.

Este cunoscut faptul că plantele secretă în mediu o serie de substanţe, de multe ori specifice – precum juglona în cazul nucului – în scopul înlăturării concurenţei altor specii. În unele cazuri, acumularea masivă în mediu a acestor substanţe, mai ales în cazul monoculturii, conduce la inhibiţia de durată, aşa-numita oboseală a solului (Calancea, 1972). Aceste substanţe (toxine) au structuri chimice tipice pentru modulatorii redox, ce implică funcţia chinonică, în cazul juglonei, acidului cafeic, esculetinei, florizinei, iar în alte cazuri funcţia triazinică (acidul cianuric) sau cromanonică (scopoletina, esculetina). Rezultatul eliberării în mediu a unor astfel de substanţe se concretizează în modificarea caracterului redox (rH) al mediului (Zănoagă, 1988), care poate fi, pentru o altă specie benefică sau nocivă în funcţie de apropierea sau depărtarea de valoarea optimă rH_0 (Zănoagă, 1986).

Prin urmare, acţiunea acestor substanţe, adică ca fenomen global – poluarea biologică, nu se deosebeşte ca mecanism prin nimic de acţiunea substanţelor bioactive pentru care s-a emis ipoteza mecanismului redox amintit mai sus (Zănoagă, 1986).

Pe de altă parte, s-a dovedit că mecanismul amintit se concretizează, cu nuanţe specifice, la mai multe niveluri de organizare ale materiei vii (Zănoagă şi colab., 1990), investigat fiind cel tisular, celular şi nuclear, iar în sisteme abiotice, cel biochimic (enzimatic), în toate aceste cazuri demonstrându-se determinismul redox al proceselor în discuţie (Zănoagă şi colab., 1988).

Luând în considerare toate acestea, lucrarea de faţă încearcă să demonstreze că şi fenomenul de alelopatie se desfăşoară după un mecanism redox şi, mai mult, se reflectă în acelaşi mod la toate cele trei niveluri de organizare menţionate.

* Institutul de Cercetări Biologice, Iaşi

Scanned with OKEN Scanner

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

S-a ales o pereche de specii, una inductoare, alta receptoare, care au fost utilizate în teste de laborator referitoare la primele stadii ontogenetice. Pentru inducerea unor condiţii dificile, deci a manifestării unui efect puternic, planta inductoare trebuie să îndeplinească o seamă de condiţii cum ar fi certitudinea secreţiei de substanţe nocive şi o dezvoltare rapidă; condiţiile amintite, la care s-a adăugat şi accesibilitatea experimentală, au determinat alegerea speciei ridichi de lună (*Raphanus sativus*) soiul Redo, provenit de la S.C.P.L. Bacău. Ca plantă receptoare, a fost utilizată secara de primăvară (*Secale cereale*), soiul Moara Domnească, provenit de la Grădina Botanică din Iaşi.

Dintre cele două variante experimentale posibile: cultivarea simultană a celor două specii sau cultivarea consecutivă, s-a ales cea de-a doua variantă, care permite separarea a două etape distincte, cu investigarea intermediară a mediului.

Cultura plantei (100 seminţe) s-a realizat în 13 pahare Berzelius, pe un substrat mecanic din vată impregnată cu apă distilată (100 ml), care au fost urmărite zilnic, timp de 12 zile, comparativ cu o probă martor (timp zero).

În fiecare zi, apa din substratul unui vas a fost extrasă şi s-a determinat rH-ul (Zănoagă şi colab., 1988). Ca substrat de germinare s-au utilizat apoi 50 ml din această apă, pentru 50 cariopse ale plantei receptoare, într-un sistem experimental similar celui precedent. După trei zile, s-au prelevat plantule, care s-au fixat cu fixator Battaglia şi conservat în etanol 70%. După alte trei zile, s-a determinat lungimea medie a rădăcinilor plantulelor de secară, valoarea $\bar{L}$ obţinută a fost aleasă ca marker al efectului la nivel tisular. În acelaşi mod s-a acţionat pentru fiecare variantă experimentală (diferite prin timpul de inducere: 0, 1, 2... 12 zile).. Toate testele de germinare s-au efectuat la temperatura constantă de 20°C şi în condiţii de întuneric.

Pentru nivelurile celular şi nuclear s-au ales ca markeri frecvenţa celulelor în diviziune mitotică, respectiv frecvenţa aberaţiilor cromozomale în ana-telofaza mitozei, în meristemul apical al rădăcinii. Aceşti parametri s-au determinat microscopic, după colorarea cu reactivul Carr.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma secreţiei de substanţe alelopatice (a căror natură nu ne-a interesat acum), rH-ul substratului de germinare şi dezvoltare a plantei inductoare a evoluat de la o valoare neutră (28,2), după o dinamică descrescătoare, cu tendinţa de plafonare la timpii de inducere mari (fig. 1). Aceasta denotă o intensitate mărită a procesului în primele stadii (germinarea propriu-zisă). Sensul descrescător indică faptul că substanţele secretate sunt reducătoare, iar efectul alelopatic devine astfel mai eficient, ştiind că plantele sunt afectate mai puternic de deplasarea rH-ului mediului spre reducător decât spre oxidant (Zănoagă, 1986).

Efectul asupra plantei receptoare este dependent redox, dependenţa sa de rH-ul indus în substrat având, ca de obicei în această situaţie, o alură gaussiană (fig. 2). Optimul de rH, reducător (19,2), denotă preponderenţa în dezvoltarea rădăcinii, a unor procese de dezasimilaţie, fapt cunoscut de altfel, dar demonstrat acum şi pe această cale (Zănoagă şi Caşcaval, 1988). Acelaşi lucru se

Scanned with OKEN Scanner

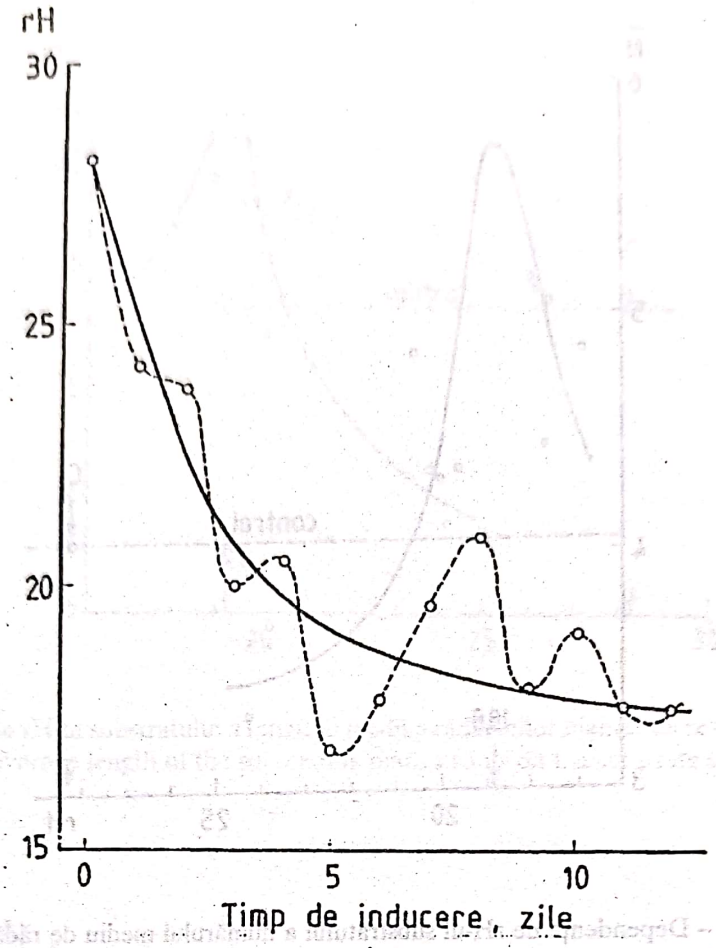


Fig. 1 – Evoluţia rH-ului în timpul germinării plantei premergătoare – ridichi de lună (rH evolution during germination of the preceding plant – early radishes)

poate spune şi despre numărul mediu de rădăcinuţe dezvoltate la fiecare plantulă receptoare (fig. 3); optimul de rH se situează la o valoare practic identică (18,8).

Frecvenţa celulelor în diviziunea mitotică, reprezentată în funcţie de rH-ul substratului (fig. 4), ia alură tipică (Zănoagă şi colab., 1990) în M (în chenar), cu minimul – în acest caz la rH 22,5, adică şi la acest nivel se respectă determinismul redox al proceselor derulate.

Frecvenţa aberaţiilor cromozomale dovedeşte, de asemenea, o dependenţă redox la nivel nuclear, printr-o alură tipică la acest nivel, anume aceea în V (în chenar) (fig. 5). Optimul (rH 23) este situat foarte aproape de cel al frecvenţei celulelor în diviziune mitotică, dar totuşi diferit, fapt firesc prin referirea la niveluri diferite de organizare a materiei vii, caracterizate de mecanisme de homostazie diferite.

Scanned with OKEN Scanner

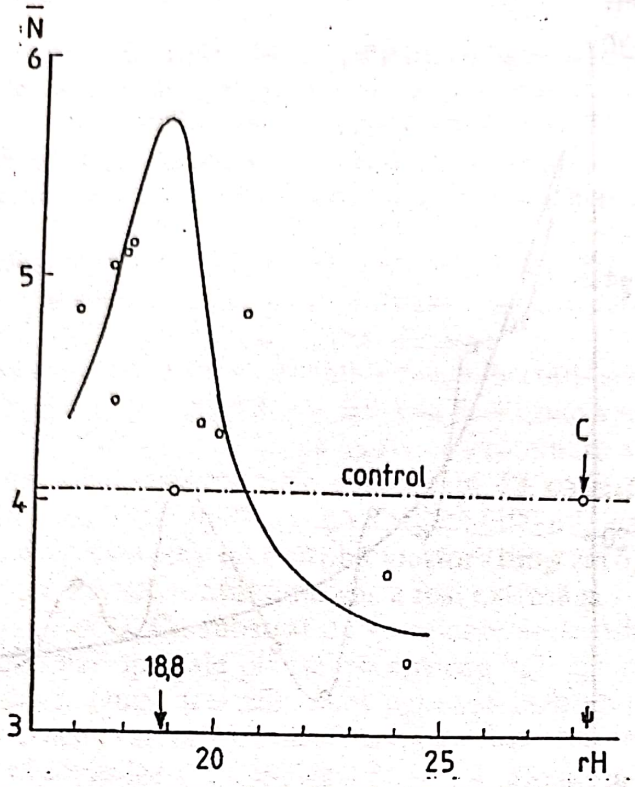


Fig. 2 – Dependenţa de rH-ul substratului a numărului mediu de rădăcini ale plantei succesoare – secară (Dependence of the average number of roots of the succeeding plant – rye, on the substrate's rH).

Relaţia, evidenţiabilă redox, dintre frecvenţa celulelor în diviziune mitotică şi cea a aberaţiilor cromozomale ne permite şi în acest caz reluarea comentariului dintr-o lucrare anterioară (Zănoagă şi colab., 1990). Astfel, în condiţii optime de mediu din punct de vedere redox, frecvenţa aberaţiilor cromozomale este minimă (foarte apropiată de cea din condiţiile martor (C) (fig. 4), ceea ce determină o anumită rată a diviziunii mitotice (minimul din fig. 5). Dar frecvenţa aberaţiilor cromozomale creşte pe măsura îndepărtării rH-ului mediului de optim, ceea ce determină mărirea, în compensare, a ratei diviziunii mitotice; mecanismul de compensare este doar parţial, întrucât la o mărire în continuare a ecartului rH-ului mediului faţă de cel optim se asistă, în paralel cu creşterea frecvenţei aberaţiilor cromozomale, la prăbuşirea razei diviziunii mitotice (acest fapt este vizibil în figura 5, doar în zona reducătoare, zona oxidantă – sugerată doar – nefiind modulată în condiţiile experimentale date).

Scanned with OKEN Scanner

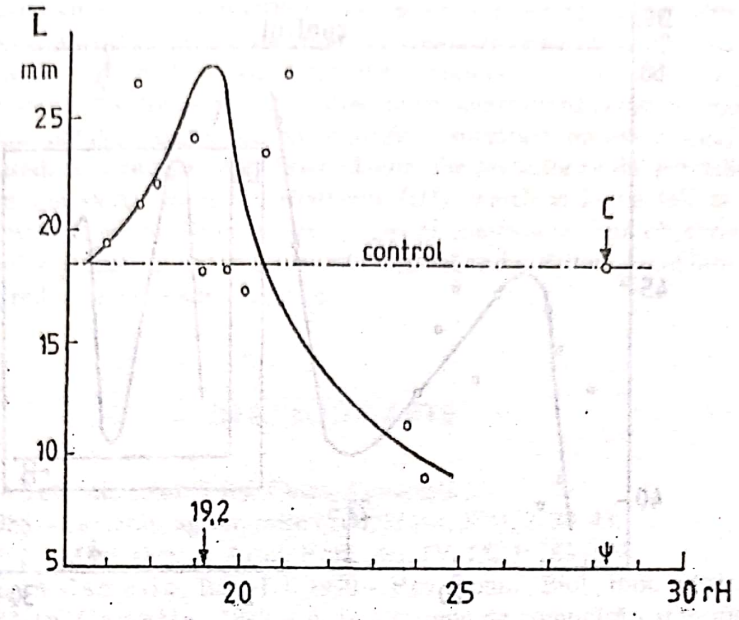


Fig. 3 – Dependența de rH-ul substratului a lungimii medii a rădăcinilor plantei succesoare (Dependence of the average length of the succeeding plant's roots on the substrate's rH)

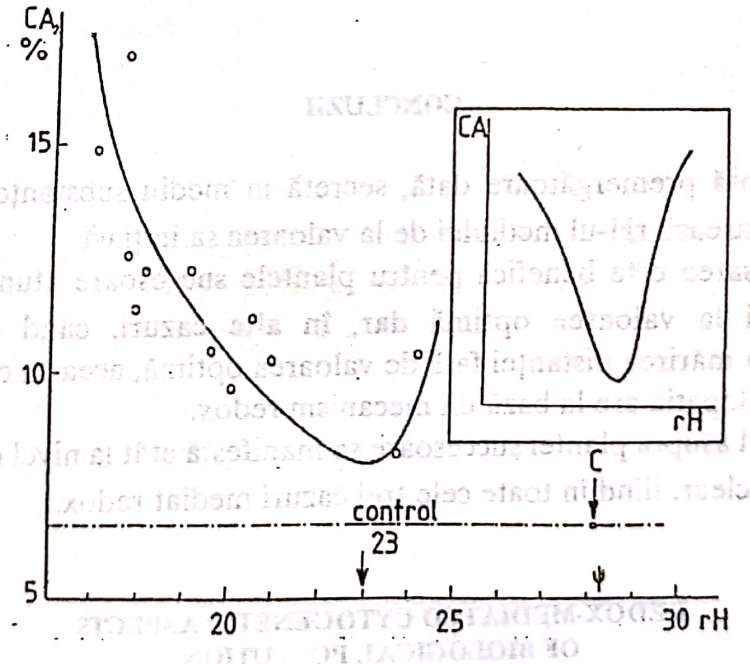


Fig. 4 – Dependența de rH-ul substratului a frecvenței aberațiilor cromosomale în ana-telofază în meristemul apical al rădăcinii plantei succesoare. În chenar, aspectul tipic al dependenței (Dependence of the frequency of cromosomical aberrations in the mytosis' ana-telophase, in the apical meristeme of the succeeding plants' root, on the substrate's rH. The border represents the typical aspects of dependence). După Zănoagă, Păun, Bara, 1990.

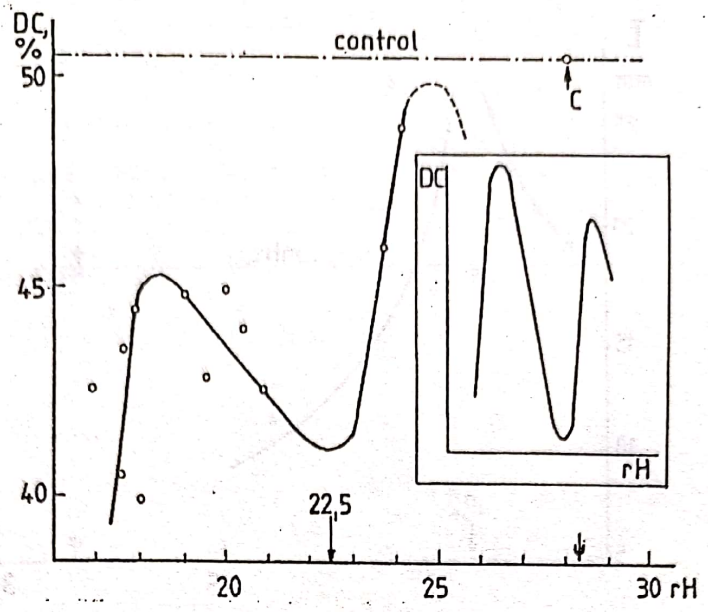


Fig. 5 – Dependenţa de rH-ul substratului a frecvenţei celulelor în diviziune mitotică, în meristemul apical al rădăcinii plantei succesoare. În chenar, aspectul tipic al dependenţei. (Dependence of the frequency of cells in mytotic division from the apical meristeme of the succeeding plant's root on the substrate's rH. The border reprezents the typical aspect of dependence). După Zănoagă, Păun şi Bara, 1990

CONCLUZII

▼ O plantă premergătoare dată, secretă în mediu substanţe modulatoare redox care deplasează rH-ul mediului de la valoarea sa iniţială.

▼ Deplasarea este benefică pentru plantele succesoare atunci când aduce rH-ul mediului la valoarea optimă dar, în alte cazuri, când deplasarea se concretizează în mărirea distanţei faţă de valoarea optimă, aceasta este nocivă. Cu alte cuvinte, alelopatia are la bază un mecanism redox.

▼ Efectul asupra plantei succesoare se manifestă atât la nivel tisular, cât şi la cel celular şi nuclear, fiind în toate cele trei cazuri mediat redox.

REDOX-MEDIATED CYTOGENETIC ASPECTS OF BIOLOGICAL POLLUTION

SUMMARY

Growth of plants is influenced by other plants which populate either successively or concurrently the respective substrate – a phenomenon inducing allelopathy or „soil's fatigue" and, through extrapolation, of biological pollution itself. We have been mainly interested to know (exactly) the level

up to which such process may be controlled and, especially, also if the process may be considered as a redox-mediated one, through the action of either chemical or radiative xenobiotic agents.

There have been also considered the markers characterizing the three organization levels (tissular, cellular and nuclear) of the living matter, namely biomimetic parameters, frequency of cells in mytotic division and, respectively, frequency of chromosomial aberrations in the mytosis' ana-telophase, on employing a test plant the rye – cultivated on an artificial substrate, on which other plant/plants has been previously cultivated. According to the obtained data, the presence of the preceding plant induces drastic modification of the substrate redox character (rH), which is to be felt at all three levels considered of the following plant, in the same way (types of aberrations) and observing the typical rH dependences – in a similar manner as in the action of chemical and radiative xenobiotic agents; in other words, it is a common, redox-mediated mechanism.

BIBLIOGRAFIE

Calancea L., 1972 – Toxinele solului. Ed. Ceres, București.
Zănoagă C. V., 1988 – Cercetări agronomice în Moldova, XXI, 2: 39–43.
Zănoagă C. V., 1986 – Mem. sect. șt. Acad. Rom., ser. IV, IX, 1: 183–190.
Zănoagă C. V., Păun Camelia, Băra I. I.,1990 – Rev. Roum., Biol., Biol. Végét., 35, 2: 137–141.
Zănoagă C. V., Păun Camelia, 1988 – A 14-a sesiune de comunicări științifice, Rm. Vâlcea, 13–15 oct. 1988. Caiet selectiv, sect. II: 54–58.
Zănoagă C. V., Neacșu I., Zănoagă Mădălina, 1988 – St. cerc. biochim., 31, 1: 53–58.
Zănoagă C. V., Caşcaval A., 1988 – Simpozionul „Contribuția factorilor naturali la crearea mediului sanogen", Iași, 28–29 mai, 1988: 125–130.

Scanned with OKEN Scanner

CERCET. GENET. VEGET. ANIM., VOL. IV, 1996

MODELAREA REGLĂRII GENETICE A REACȚIEI ORGANISMELOR LA TEMPERATURI SUPRAOPTIME

I. DECUSEARĂ, A. GH. JACOTĂ*

In lucrare este prezentat modelul teoretic al sistemului reglării (SR) expresiei genelor responsabile de sinteza proteinelor șocului termic (PȘT), care se prezintă ca o reacție cu efect general, în cazul când organismele sunt expuse acțiunii temperaturilor supraoptimale și/sau altor factori biotici și abiotici de stres.

Analiza teoretică a sistemului de ecuații diferențiale care descrie dinamica concentrațiilor PȘT, ARNm proteinelor respective și inductorul expresiei - factor de natură proteică (obținerea stărilor staționare și analiza stabilității acestor stări), folosind un set de parametri tipici celulei eucariote, atestă că sistemul de reglaj al genelor șocului termic are caracterul unui sistem „trigger" în cadrul căruia sinteza ARNm PȘT se realizează cu o singură viteză, care corespunde vitezei maxime. Sistemul este protejat de influența fluctuațiilor factorilor externi, de către o concentrație-limită a ARNm, sinteza efectivă având loc numai după depășirea acestei concentrații-limită. Se analizează rolul unor PȘT în calitate de autoreglatori ai expresiei genetice.

Sinteza proteinelor șocului termic (PȘT) se prezintă ca o reacție cu caracter general în celulele expuse temperaturilor infra- și supraoptime și/sau influenței altor agenți biotici și abiotici.

Una din etapele cheie ale reglării sintezei PȘT rezidă la nivel transcripțional, expresia genelor care codifică proteinele menționate fiind determinată de acțiunea a cel puțin doi factori principali: secvențe ADN cis și factori proteici trans (Tanguay, 1988; Kimpel și colab., 1990).

Se presupune că interacțiunea dintre aceste două elemente este de tip complementar ceea ce conferă întregului sistem de reglare (SR) al genelor șocului termic (ȘT) proprietățile unui sistem „trigger" (Tanguay, 1988).

* Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova

Scanned with OKEN Scanner

Ca urmare a cercetărilor desfăşurate de numeroase colective a fost propus modelul ipotetic empiric al reglării genetice în care pe lângă elementele indicate mai sus, se ia în considerare şi etapa posttranscripţională a sistemului de reglare, care include în sine reglarea stabilităţii ARNm proteinelor şocului termic şi translaţia selectivă a acestuia (fig.1) (Gurley şi Key, 1991).

Menţionăm, de asemenea, detectarea comportamentului neliniar al termorezistenţei aparatului fotosintetic al frunzelor sub influenţa şocului termic, fapt care atestă şi caracterul complementar al variaţiilor structurale-funcţionale ale acestuia (Veselovskii şi colab.,1993).

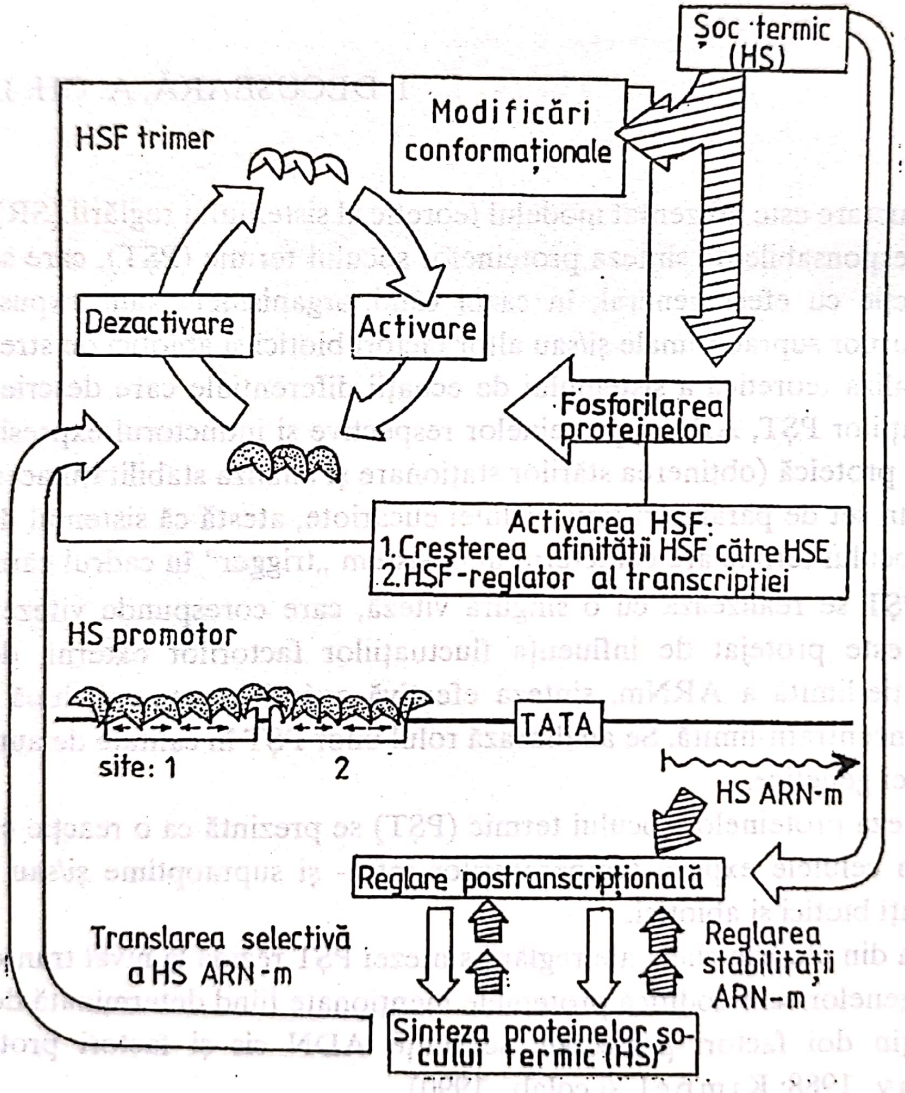


Fig. 1 – Modelul empiric integrativ al expresiei genelor şocului termic (Empiric integrating model of heat shock genes expression)

Din ansamblul reacţiilor ce au loc în celulele organismului la temperaturi supraoptime, a fost cercetat în special procesul de sinteză a proteinelor şocului termic de la expresia genelor până la elucidarea stărilor de agregare a sistemelor polisomice, datele experimentale privind fenomene de degradare a biopolimerilor în aceste condiţii sunt relativ mai restrânse (Blehman şi Selamova, 1992).

In lucrarea de faţă este prezentat un model teoretic care vizează elucidarea unor aspecte ale sistemului de reglare a expresiei genelor proteinelor şocului termic, care include atât descrierea proceselor de sinteză, cât şi pe cele de degradare a biopolimerilor.

Cum s-a menţionat mai sus, posedând proprietăţile unui sistem "trigger", pentru activarea grupului de gene care codifică proteinele şocului termic. In majoritatea cazurilor studiate este necesară cuplarea proteinelor reglatoare cu două sau mai multe elemente ale zonei prepromotorice a genelor implicate. Sunt exceptate de la regula generală unele bacterii *(S. cerevistice, E. coli)* la care factorul şocului termic (FŞT) – proteina/proteinele reglatoare formează un complex cu ADN atât în condiţii normale, cât şi în cazul unor temperaturi anormale (Sorger, 1991; Sorger şi Pelham, 1988).

In general, la organismele vii, fenomenul de asociere a unei macromolecule cu doi sau mai mulţi complecşi moleculari este larg răspândit. Dacă considerăm situaţia ce se realizează în cazul când molecula P cuplează secvenţial *n* moleculele [X] trecând prin *n* stadii consecutive ce pot fi descrise de *n* constante de formare a complecşilor $PX_1, PX_2, \ldots PX_n : K_1, K_2, \ldots, K_n$,

unde:

$$P + X \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} PX^1$$

$$PX^1 + X \underset{K_{-2}}{\overset{K_2}{\rightleftarrows}} PX^2$$

$$\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots$$

$$PX^{n-1} + X \underset{K-n}{\overset{K_n}{\rightleftarrows}} PX^n$$

Şi modificând ecuaţia lui Eder, care descrie frecvenţa centrilor ocupaţi ai moleculei P, obţinem pentru viteza de sinteză ARNm al proteinei şocului termic următoarea relaţie (Metzler, 1977):

$$\frac{dA}{dt} = \frac{1}{n} \frac{\sum_{i=1} i \cdot \phi_1 \cdot [X]^1 \cdot A_{\max.}^{(i)}}{1 + \sum_{i=1} \phi i \cdot [X]^i}$$

în care:

n = numărul de centri ocupaţi;

X = concentraţia FŞT;

A_{max} = viteza de sinteză a ARNm la etapa i;

$Ø_1, Ø_2 \ldots Ø_n$ = produsul constantelor de formare a complecşilor $PX_1, PX_2, \ldots PX_n$;

$Ø_1 = K_1; Ø_2 = K_1 \cdot K_2; \ldots . Ø_n = K_1 \cdot K_2 \cdot \ldots \cdot K_n$.

Ţinând cont de aceasta , sistemul de ecuaţii diferenţiale care descrie triggerul devine:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{1}{n} \frac{\sum_{i=1} i \cdot \phi_1 \cdot [X]^i \cdot A_{max}^{(i)}}{1 + \sum_{i=1} \phi_1 \cdot [X]^i} - \frac{A}{\tau A}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{A}{\tau f} - \frac{P}{\tau p} \qquad (1)$$

$$\frac{dF_a}{dt} = K_d \cdot F_i - \frac{F_a}{\tau f}$$

$$\frac{dF_i}{dt} = K_p \cdot f_i \cdot P - K_d \cdot F_i$$

In acest sistem A, P, F_a , F_i reprezintă concentraţiile ARNm proteinei şocului termic, ale factorului şocului termic activ şi inactiv, respectiv;

τ_A , τ_p , τ_a = durata de existenţă a ARNm proteinelor şocului termic şi respectiv;

τ_f = timpul de sinteză a PŞT;

K_d = constanta de dimerizare a factorului şocului termic (se admite că FŞT adoptă o configuraţie activă ca rezultat al dimerizării unor complecşi inactivi care, la rândul lor, pot fi monomeri, dimeri, trimeri etc.) (Gurley , Key, 1991; Sorger, 1991).

Sistemele "trigger", cu regim de funcţionare multistabil (bifurcaţională), oferă posibilitatea reducerii modelelor la diferite niveluri de complexitate, care includ comportamentul acestora într-un model de bază datorită existenţei punctelor de bifurcaţie. In proximitatea acestui (acestor) punct (puncte), indiferent de complexitatea obiectului în studiu şi eventual de numărul de parametri incluşi în descrierea lui, putem evidenţia un set redus de variabile adecvate dinamicii obiectului definite ca parametri de dinamică. Modificându-şi într-o măsură mai mare valorile, parametrii menţionaţi definesc dinamica sistemului prin punctul (punctele) de bifurcaţie (Stoliarov şi Cernavskii, 1992).

Limitându-se la studierea reglării expresiei genetice la nivelul transcripţional, vom considera parametru de dinamică, concentraţia ARNm. Pentru aceasta, este suficientă considerarea ratei concentraţiei proteinelor de şoc termic ARNm acestor proteine P ~ A raport ce se realizează în cazul când $\tau_p \ll \tau_A$. In cele mai multe situaţii ipoteza este confirmată de datele experimentale (Atkinson şi Walden, 1985). In acest caz obţinem:

Scanned with OKEN Scanner

$$\frac{A}{\tau_f} - \frac{P}{\tau_p} = 0;\ A = \frac{\tau_A}{\tau_p} \cdot P;\ P = \frac{\tau_A}{\tau_p} \cdot A \qquad (2)$$

In consecinţă, pentru dinamica concentraţiei factorului şocului termic obţinem relaţiile:

$F_1 \sim \exp(-f(t) \cdot t);\ F_a \sim (1/f(t) \cdot \exp(-f(t) \cdot t)$ (3)

Raportul valorilor parametrilor incluşi f(t) determină descreşterea rapidă a concentraţiei factorului şocului termic, fapt ce diminuează rolul de reglator al transcripţiei genelor şocului termic. In opinia noastră, funcţia primordială a acestui factor o reprezintă activitatea lui în calitate de subsistem sensibilizator al factorului stresant, în structura ierarhică a mecanismului complex al reacţiei la agenţii externi (Vidybida, 1992).

Din cele expuse mai sus pe baza sistemului (1), implicînd şi condiţiile (2) obţinem pentru viteza de variaţie a ARNm proteinelor de şoc termic relaţia:

$$\frac{dA}{dT} = F(A)$$

unde:

$$F(A) = \frac{1}{n^*} \frac{\sum_{i=1} i \cdot \phi_i \cdot [X]^1 \cdot A_{max}^{(i)}}{1 + \sum_{i=1} \phi i \cdot [X]^i} - \frac{A}{rA} \qquad (4)$$

în care:

n* reprezintă constanta lui Hill care, spre deosebire de constanta n, este un indicator al proceselor parţial cooperante (n este egal cu numărul de molecule X cuplate cu macromolecula P în cazul cooperării metabolice totale, $n^*/n \leq 1$).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pentru un set de parametri care descriu în general procesele de sinteză şi de degradare a biopolimerilor menţionaţi, în care au loc în celulele expuse la temperaturi ridicate, a fost soluţionată grafic ecuaţia 4. Aceşti parametri sunt:

$K_1 \cong 1$; $K_2 \cong 10 - 15$; $K_3 \cong 80 - 100$; $A_{max}^{(1)} = 1$; $A_{max}^{(2)} = 5$;

$A_{max}^{(3)} = 10$; $\tau_A \cong 4 - 10 \cdot 10^3$ s; $\tau_p = 10^4 - 10^5$ s.

Viteza de variaţie dA/dt a ARNm, în relaţie cu concentraţia acestuia pentru n = 1, 2, 3 şi pentru diferite durate de existenţă ale ARNm, este prezentată în figura 2.

In cazul când n = 1, adică are loc cuplarea unui sector al zonei promotorice (SŞT) cu o proteină reglatoare, SR posedă numai o stare stabilă, ea corespunzând cazului A = 0. SR corespunde unui regim "trigger" de funcţionare în cazul când n ≥2 (în cazul nostru n = 2, n n = 3. În acest caz se indentifică existenţa a trei stări staţionare $[X_1]$, $[X_2]$, $[X_3]$.

Scanned with OKEN Scanner

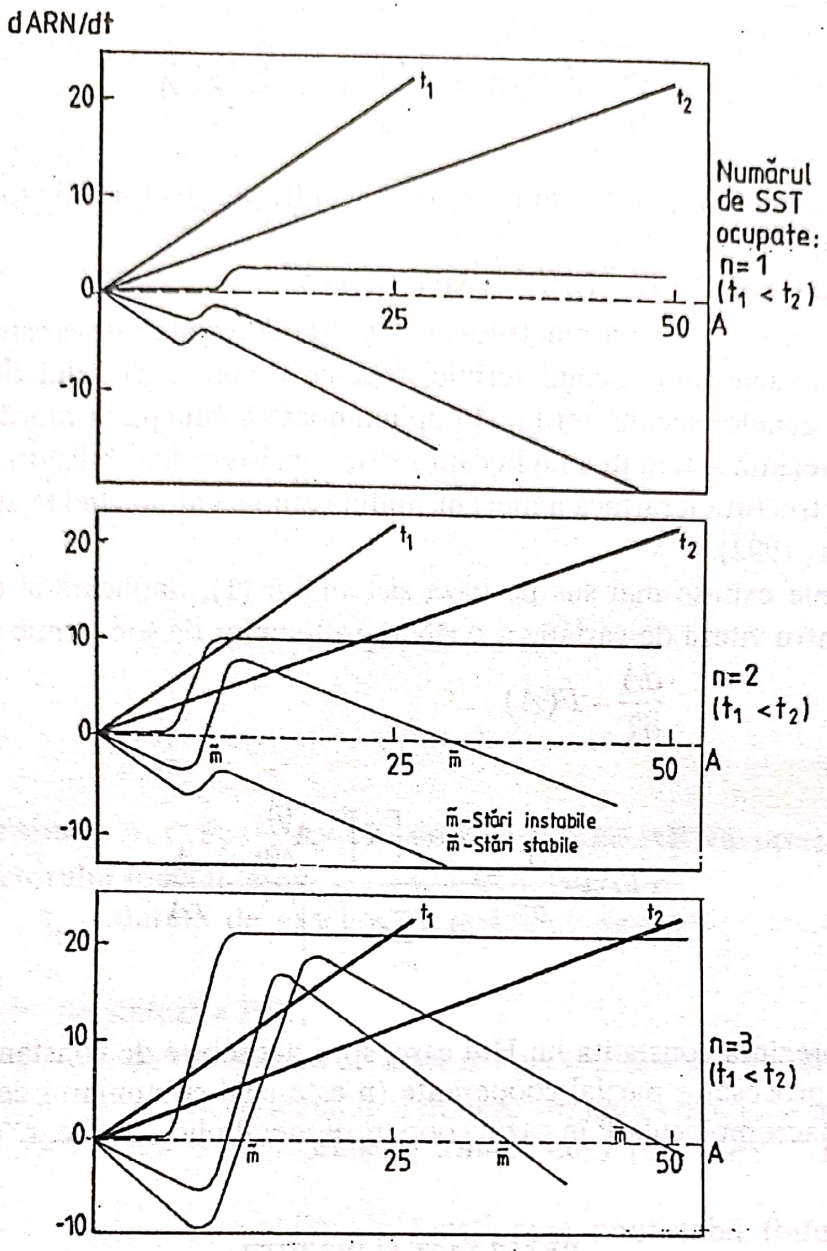


Fig. 2 – Dependența dARN/dt de concentrația ARN m pentru diferite durate de existență (t_1 și t_2) a ARN m (dependence of dRNA-dt on RNAm concentration for the different longevity (t_1 and t_2) of RNAm)

Analiza elementară a stabilității acestor stări, aplicând criteriul Lyapunov, indică stabilitatea stărilor $[X_1] = 0$, și $[X_3]=A$ și instabilitatea stării $[X_2] = A$ (Rubin , 1987). Prin urmare, SR posedă două stări stabile ($[X] = 0$ – când ARNm nu este sintetizat *de novo*, $[X_3] = A$, când se acumulează concentrația maximă a ARNm), tranziția dintre aceste stări se efectuează prin starea instabilă $[X_2]$ a cărei valoare este proporțională cu constantele de cuplare K_n. Procesele de tranziție, dependența lor de factorii externi și modurile de dirijare a acestor procese constituie obiectul unor cercetări ulterioare.

După cum s-a menţionat mai sus, cuplarea SŞT cu o moleculă a proteinei reglatoare indică o lipsă a stărilor staţionare în care concentraţia ARNm ar fi diferită de cea nulă (fig. 2). Rezultatele empirice de studiere a celulelor eucariote expuse temperaturilor înalte (în afara cazurilor indicate mai sus), atestă pentru acest caz că nu are loc o sinteză efectivă a ARNm şi, în consecinţă, a PŞT (Schlesimger, 1990).

Pentru sinteza efectivă a ARNm PST, este necesară succesiunea a cel puţin două SŞT, fenomen ce poate fi detectat în cazul proteinelor cu masă moleculară redusă (Gurley şi Key, 1991).

Concomitent cu fenomenul indicat, trebuie menţionată necesitatea creşterii duratei de existenţă a ARNm, pentru a se atinge nivelul concentraţiilor ce corespund stărilor stabile. Fenomenul de amplificare a stabilităţii ARNm proteinelor şocului termic şi translarea selectivă a acestora se manifestă ca una dintre etapele – cheie ale SR (Gurley şi Key, 1991; Sorger, 1991).

Cuplarea SŞT cu trei proteine reglatoare, care se realizează în complexul ADN – proteine reglatoare al proteinelor şocului termic cu masa moleculară mare, duce atât la o creştere considerabilă a vitezei de sinteză a ARNm, cât şi la formarea stărilor staţionare cu un pronunţat grad de stabilitate; aceste stări sunt protejate de un nivel ridicat al concentraţiilor ARNm faţă de influenţa factorilor aleatori ai mediului. Excluderea celui de al treilea SŞT din zona prepromotorică a genelor ce codifică proteinele şocului termic cu masa moleculară mare (PŞT 70 etc.), reduce aproximativ de două ori concentraţia totală a acestora în celulă (Gurley şi Key, 1991).

Din rezultatele prezentate mai sus putem deduce că în urma realizării regimului "trigger" sinteza ARNm al proteinelor şocului termic se efectuează cu o singură viteză ce corespunde celei maxime. Sistemul este protejat de influenţa fluctuaţiilor factorilor externi de către o concentraţie – limită a ARNm, sinteză efectivă a acestuia având loc numai după depăşirea acestei concentraţii – limită (Vasiliev şi colab., 1979).

Analiza formulelor oferă o explicaţie a fenomenului de sinteză nelimitată a ARNm şi de blocare a sintezei proteinelor şocului termic, proces observat în cazul expunerii celulelor la temperaturi mari.

MODELLING OF THE GENETIC REGULATION OF THE ORGANISMS TO THE OVER MOST FAVOURABLE TEMPERATURES

SUMMARY

The paper presents the theoretical model of the regulation system (RS) of the action of responsibile genes for the synthesis of heat shock proteins (HSP) as a reaction having a general character in event of the organisms exposing to the action of the over most favourable temperatures an/or to the other biotic and abiotic factors.

The system of the differential equations describes the dinamics of the HSP and RNA-m of the respective proteins and of the expression inductor – the factor of proteic nature – and estimates the synthesis process of biopolymers and also degradation processes. At the same time it has been noticed the favourable influence of RS on the interaction between the inductor and specific sequents of the pre-promoters zones of specified genes.

Scanned with OKEN Scanner

Theoretical analysis of this system (obtaining of the stationary state, analysis of these states) using a set of typical parameters for enkariot genes points out that the regulation system of the thermic shock behaves like a "trigger" system during which the synthesis of RNA-m is achieved with the maximum speed. The system is protected from influence of the external factors by limiting concentration of RNA-m, whose effective synthesis takes place only after exceeding of this concentration. It was studied the role of some PST as self –regulators of genetic expression.

BIBLIOGRAFIE

Blehman G. I., Selamova N. A., 1992 – Sintez i rasped makromolekul v usloviah stressa. Uspehi sovr. biol., 112. 281–297.

Gurley W. B., Key J. L., 1991 – Transkriptional regulation of the heat-shock response: a plant perspective. Biochemistry, 30: 1–12.

Kimpel J. A., Nago R. T., Key J. L., 1990 – Transkriptional regulation of the heat-shock response in soybean seedlings. Plant Physiol., 94: 988–995.

Metzler D. E., 1977 – Biochemistry. Acad. Press N. Y.

Rubin A. B., 1987 – Biofizica, M. „Vâsşaia şkola, 1: 319 p.

Sorger P. K., Pelham H. R., 1988 – Yeast heat shock facor. Cell, 54: 855–864.

Schlesinger M. J., 1990 – Heat shock proteins. JBC, 256: 12111–12115.

Sorger R. K., 1991 – Heat shock factor and the heat-shock response. Cell, 65: 363–366.

Stoliarov M. N., Cernavskii D. S., 1992 – O variabilnosti biologhiceskih sistem. Biofizica, 37: 363–372.

Tanguay R. M., 1988 – Transcriptional activation of heat-shock in eukuariotis. Biochem. Cell Biol., 66: 584–593.

Vasiliev V. A., Romanovskii Y. B., Yahno V. G., 1979 – Avtovolnovîe processî v raspredelennîh kineticeskih sistemah. Usp. fiz. nauk, 128: 626–663.

Vidybida A. K., 1992 – Selectivity and sensitivity of cooperative system in the presence of thermal noise. Preprint of the Institute for Theor. Phys. Ukr. Acad. Sci: 16.

Veselovskii V. A., Veselova T. V., Cernavskii, D. S., 1993 – Stress rastenia. Biofiziceskii podhod. Fiziologia rastenii, 40, 4: 553–557.

* * *, 1985 – Changes in Eukariotic Gene Expression in Response te Envirommental Stress, Eds by B.G. Atkinson and D.B. Walden. Acad. Press Inc. 378 p.

Scanned with OKEN Scanner

EVALUAREA DIVERSITĂȚII GENETICE GENERATE DE CULTURA *IN VITRO* LA GRÂU PRIN INTERMEDIUL UNOR MARKERI MOLECULARI

IOANA HAGIMA *, ELENA MARCELA BADEA **,
IRINA HOLOBIUC **

Nu toate plantele derivate din culturi de celule și țesuturi prezintă un fenotip normal, așa-numita variație somaclonală (Larkin și Scowcroft, 1981) fiind manifestată atât de regeneranți (Ro), cât și de descendenții acestora (R_1, R_2 etc.). Factorii majori care afectează amplitudinea variației somaclonale la plantele derivate din culturi de țesuturi sunt: genotipul, originea explantului inițial, compoziția mediului de cultură, durata culturii. Încă nu se știe cu certitudine dacă mediul de regenerare (embriogeneza sau morfogeneza) influențează spectrul și frecvența variațiilor generate de cultură *in vitro*.

La grâu, s-a constatat că variantele somaclonale manifestă modificări atât morfologice, cât și biochimice (Maddock și colab., 1985; Bajaj și colab., 1986; Davies și colab., 1986; Ryan și Scowcroft, 1987). Concomitent au fost publicate și rezultatele unor evaluări în câmp ale variantelor somaclonale (Maddock și Semple, 1986), ca și ale unor studii de eritabilitate, în special pentru variațiile apărute la nivelul proteinelor gliadinice (Cooper și colab., 1986).

Cercetările de față au avut drept scop evaluarea variației induse la nivelul locilor care codifică gluteninele cu greutate moleculară mare, beta-amilaza și fosfataza acidă, ca urmare a regenerării din calusuri cu origine diferită: microspori și embrioni imaturi.

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

Materialul biologic folosit: o linie dihaploidă de *Triticum aestivum* obținută prin diploidizarea unui haploid generat prin cultura anterelor *in vitro*, selecționată pentru aptitudine androgenetică cultivată în câmpul experimental al Institutului de Biologie, București (generația R_1).

* Institutul de Cercetări pentru Cereale și Plante Tehnice, Fundulea
** Institutul de Biologie, București

Pentru regenerarea plantelor prin androgeneză, anterele cu microspori în stadiul unicelular au fost prelevate aseptic şi cultivate pe mediul N 6 (Chu, 1978) suplimentat cu zaharoză 90 g/l şi 2,4-acid diclorfenoxiacetic (2,4-D) (1,5 mg/l). După apariţie, calusurile au fost cultivate pentru creşterea pe mediul de bază MS (Murashige şi Skoog, 1962), suplimentat cu 2 mg/2,4-D. După 2–3 săptămâni, calusurile au fost transferate pe mediul de regenerare MS, suplimentat cu 2 mg/l kinetină şi 1 mg/l acid indolil acetic. Lăstarii obţinuţi au fost pasaţi pe mediul MS fără hormoni pentru formarea rădăcinilor, iar diploidizarea s-a realizat prin tratamentul cu colchicină 0,25% în faza de înfrăţire. De la plantele donatoare de antere au fost recoltaţi ulterior şi embrionii imaturi (0,5–1,5 mm), care au fost cultivaţi pentru inducerea calusului pe mediul MS suplimentat cu 2 mg/l 2,4-D. Pentru regenerarea plantelor a fost utilizat acelaşi protocol descris mai sus ca şi în cazul calusurilor cu origine polinică.

Pentru evaluarea variabilităţii *în vitro,* au fost folosite seminţe de la soma – şi gametoclone (R_1) şi s-a recurs la markeri biochimici: proteinele: glutenine cu greutate moleculară mare, beta-amilaza şi fosfataza acidă, al căror determinism genetic la grâu este bine cunoscut (tabelul 1).

Tabelul 1

Localizarea cromozomală a genelor implicate în biosinteza proteinelor de rezervă şi a celor enzimatice

(Chromosomal and genes location involved in enzymic and storage proteins biosynthesis)

Genom/ cromozom (Genome/ chromosome)	A	B	D	Autori, ani (Authors, years)
	Braţ lung (Long arm)	Braţ lung (Long arm)	Braţ lung (Long arm)	
1	Subunităţi gluteninice cu greutate moleculară mare (HMV)	HMV	HMV	Payne şi Lawrence, 1983; Lookhart şi colab., 1993; Hagima şi Săulescu,1987
	Beta-amilaza totală	–	Beta-amilaza totală	Joudrier şi Cauderon, 1976
4	Beta-amilaza totală	–	Beta-amilaza totală	Joudrier şi Bernard, 1977
			Beta-amilaza totală	Ribalka şi Sozinov, 1980
4	Fosfataza acidă	Fosfataza acidă (Braţ scurt)	Fosfataza acidă	Hart, 1973 Torres, 1976 Hagima, 1983, 1986
5	Beta-amilaza	Beta-amilaza	–	Nevo şi colab., 1993

Electroforeza subunităţilor gluteninice cu greutate moleculară mare a urmat metoda descrisă de Payne în anul 1985 (citat de Hagima şi Săulescu, 1987) cu unele modificări impuse de cerinţe obiective. Sistemul de migrare a fost pe placă în gel de poliacrilamidă 15% cu adaos de dodecil sulfat de sodiu, în tampon tris-glicocol. Soluţia de colorare a conţinut Coomassie blue R-250, etanol şi acid triclor-acetic. Numerotarea subunităţilor şi estimarea aportului lor în conferirea calităţii de panificaţie s-a realizat conform normelor elaborate de autorul mai sus menţionat.

Electroforeza beta-amilazei totale s-a efectuat în tuburi, în sistem vertical, în gel de poliacrilamidă 5%, în tampon tris-beta-alanină. Acelaşi tampn s-a utilizat şi pentru extracţie, dar cu adaos de 2-mercaptoetanol 1,5%. Drept substrat s-a utilizat amidonul 1,6%, iar relevarea activităţii enzimatice s-a efectuat în soluţie de iod în iodură de potasiu. Amănunte suplimentare sunt date într-o lucrare anterioară (Hagima şi Ittu, 1986).

Electroforeza fosfatazei acide s-a realizat în acelaşi sistem vertical şi tot în tuburi, dar în condiţii experimentale deosebite care au constat în: concentraţia gelului de poliacrilamidă a fost de 7%, tamponul de extracţie şi cel de migrare a fost tris-glicocolul. Activitatea enzimatică s-a evidenţiat prin imersarea gelurilor într-o soluţie de tampon acetat ce a conţinut 1-naftil-fosfatul ca substrat şi Fast-Gârnetul drept cuplant.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Proteinogramele gluteninelor. La toate plantele regenerate din calusurile cu originea în microspori şi în embrioni imaturi a fost înregistrat un singur tip de modificare a subunităţilor gluteninice cu greutate moleculară mare, comparativ cu linia parentală: dispariţia fracţiei 9 şi apariţia fracţiei 8 (fig. 1).

Alelele care codifică aceste fracţii sunt plasate pe cromozomul 1 B. Această modificare este considerată a fi datorată unei mutaţii apărute în timpul culturii *in vitro*, nefiind prezentă la materialul donator.

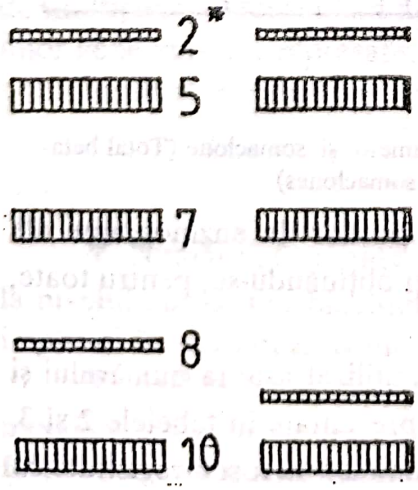


Fig. 1 – Tipuri de proteinograme (The proteinogram types)

Enzinogramele beta-amilazei şi fosfatazei acide. La gametoclone au fost obţinute două tipuri noi de enzimograme ale beta-amilazei (II şi III), iar la somaclone – cinci tipuri noi (II–VI) comparativ cu martorul, toate caracterizate printr-un număr variabil de benzi adiţionale (fig. 2).

În privinţa poliformismului mai accentuat înregistrat în cazul beta-amilazei merită menţionat următorul aspect descris de Sharp şi colaboratorii săi (1988): utilizându-se enzimele de restricţie şi tehnica focalizării izoelectrice în studiul locilor beta-amilazei din grâu s-a constatat prin ambele tehnici că un rol însemnat în conturarea acestui polimorfism îl au rearanjările la nivelul moleculei de ADN.

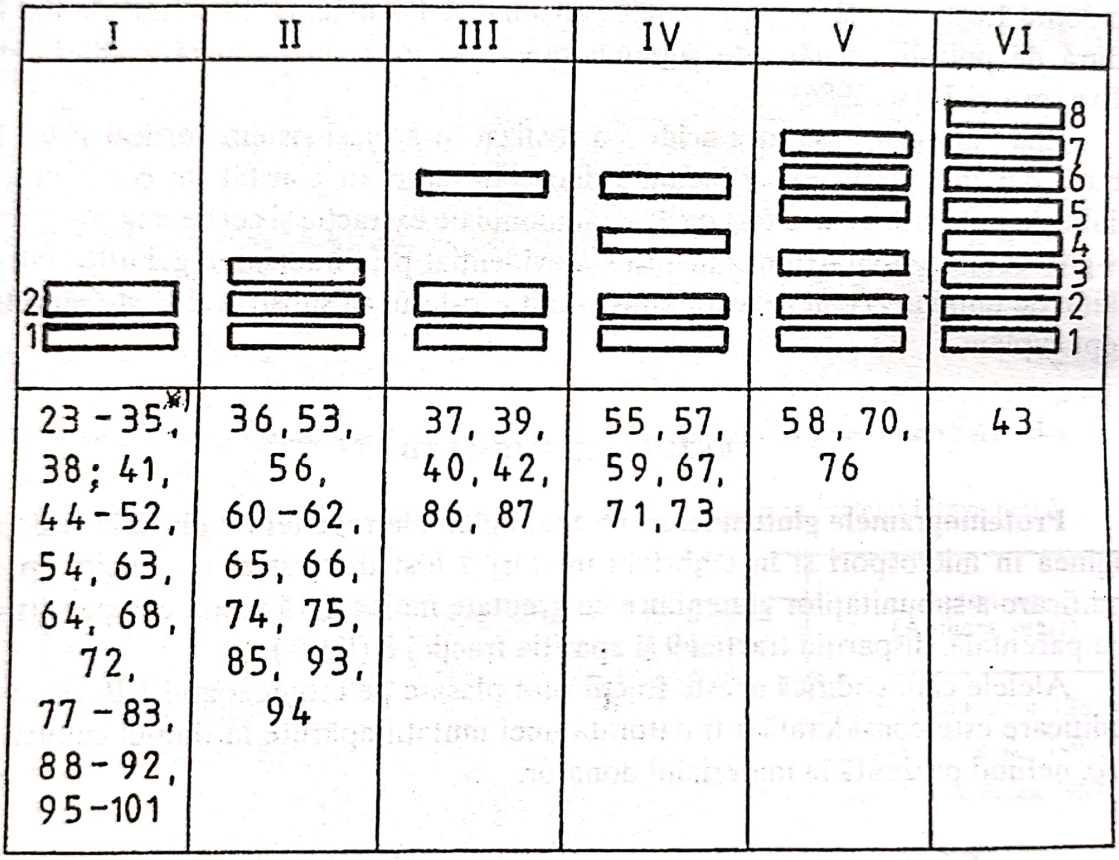


Fig. 2 – Tipurile de enzimograme ale beta-amilazei totale din gameto- şi somaclone (Total beta-amylase zymogram types from gameto-and somaclones)

Nu au fost înregistrate deosebiri în privinţa tipurilor de enzinograme ale fosfatazei acide, între formele parentale şi regeneranţi obţinându-se, pentru toate, un singur tip.

Rezultatele studiului influenţei tipului de calus utilizat asupra numărului şi frecvenţei variaţiei generate de cultura *in vitro* sunt prezentate în tabelele 2 şi 3. Variaţii la nivelul proteinogramelor subunităţilor gluteninice au fost înregistrate cu o frecvenţă de 25% la gametoclone şi de numai 5% la somaclone (tabelul 2).

Scanned with OKEN Scanner

Întregul material studiat a avut aceeaşi origine, frecvenţa variaţiilor enzimogramelor beta-amilazei a fost de numai 13% la gametoclone şi de 59% la somaclone (tabelul 3).

Tabelul 2

Numărul şi frecvenţa variaţiilor subunităţilor gluteninice cu greutate moleculară mare la gameto-şi somaclone comparativ cu linia de origine

(Number and frequency of variations for glutenin subunits with high molecular weight in gameto- and somaclones, comparing with original line)

Tipul regenerării (Regenerants type)	Nr. plante analizate (No. analyzed plants)	Tipuri de proteinograme (Proteinogram types)				Total variaţii (Variations total)	
		I (+ martor) (+ control)		II		nr.	%
		nr.	%	nr.	%		
Gametoclone	16	12	75	4	25	4	25
Somaclone	38	36	95	2	5	2	5

Numărul, frecvenţa şi amplitudinea variaţiilor generate de originea calusului la nivelul proteinogramelor au avut valori diferite în funcţie de locii studiaţi şi de sistemul de regenerare utilizat. Un singur tip de modificare a fost înregistrat în cazul locilor implicaţi în sinteza gluteninelor cu greutate moleculară mare, iar frecvenţa acestei modificări a fost mai mare la plantele regenerate prin androgeneză. Modificările induse de cultura *in vitro* la nivelul locilor ce codifică beta-amilaza au atins cote superioare, atât ca amplitudine, cât şi ca frecvenţă, la plantele regenerate din calusurile induse din embrioni imaturi.

Nu a fost înregistrată nici o modificare la nivelul locilor implicaţi în sinteza fosfatazei acide.

Într-o lucrare referitoare la mecanismele implicate în apariţia acestor modificări: detectarea unor subunităţi proteice noi, apariţia unor fracţii enzimatice noi, sau modificarea mobilităţii lor electroforetice, Larkin şi colaboratorii (1984) apreciază că rearanjamentele induse în cultură ar putea altera expresia unei familii de multigene, determinând fie represia unor gene anterior exprimate, fie depresia unor gene anterior represate.

CONCLUZII

▼ Numărul, frecvenţa şi amplitudinea variaţiilor generate de cultura *in vitro* la nivelul markerilor biochimici studiaţi au avut valori diferite, în funcţie de locii implicaţi în biosinteza componentelor respective şi de originea calusului utilizat.

▼ Atât la gametoclone, cât şi la somaclone a fost înregistrat un singur tip de modificare a compoziţiei în subunităţi gluteninice. În schimb, la gametoclone au fost obţinute două noi tipuri de enzimogramă pentru beta-amilază, iar la somaclone s-au conturat cinci tipuri de enzimograme.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3

Numărul și frecvența variațiilor enzimogramelor beta -amilazei la gameto-și somaclone comparativ cu linia de origine
(Number and frequency variations for beta-amylase zymograms in gameto- and somaclones, comparing with original line)

Tipul regenerării (Regeneration type)	Număr plante analizate (No. of analyzed plants	Tipuri de enzinograme (Zymogram types)												Total variații (Total variations)	
		I (+ martor) (+ control)		II		III		IV		V		VI			
		nr.	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%
Gametoclone	16	14	87	1	6,5	1	6,5	–	–	–	–	–	–	2	13
Somaclone	39	16	41	9	23	3	9	6	15	3	9	1	3	22	59

Scanned with OKEN Scanner

▼ În cazul fosfatazei acide nu au fost evidenţiate modificări induse ca urmare a culturii *in vitro* sau a regenerării.

▼ Regenerarea din calusuri cu originea în microspori (androgeneză) a determinat o fecvenţă mai mare a variaţiilor pentru subunităţile gluteninice cu greutate moleculară mare, în timp ce regenerarea din calusuri cu originea în embrioni imaturi a indus o frecvenţă mai mare a variaţiilor enzinogramelor beta-amilazei.

THE EVALUATION OF THE GENETIC DIVERSITY GENERATED BY *IN VITRO* CULTURE IN WHEAT (TRITICUM AESTIVUM) USING SOME MOLECULAR MARKERS

SUMMARY

A study has been performed of the spectra of the storage proteins – high molecular weight (HMW) glutenin subunits, beta-amylase and acid phosphatase, in gametoclonal and somaclonal variants derived from the same dihaploid line. Only one new type of proteinogram was obtained in the case of high molecular weight glutenin subunits with a higher frequency for gametoclone than somaclone.

Regarding the zymograms of beta-amylase, two new types for gametoclones and five new ones for somaclones were recorded but with a higher frequency in somaclones than gametoclones. No modifications were obtained for acid phosphatase zymograms. The obtained results showed that there is a variability induced by *in vitro* culture depending of calus origin.

BIBLIOGRAFIE

Bajaj Y. P. S., Gill M.S., Mahapatra D., 1986 – Somaclonal and gametoclonal variation in wheat, cotton and brassica.
In: Somaclonal Variations and Crop. Improvement. J. Semal, ed.: 160–169. Martinus Nijhoff, Dordrecht.

Chu C., 1978 – The N 6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: Proc. Symp. Plant. Tissue Cult., Science Press, Beijing: 45–50.

Cooper D. B., Sears R. G., Lockhart . L., Jones B. J., 1986 – Heritable somaclonal variation in gliadin proteins of wheat plants derived from immature embryo callus culture. Theor. Appl. Genet., 71: 784–790.

Davies P. A., Pallota M.A., Ryan S. A., Scowcroft W. R., Larkin P. J., 1986 – Somaclonal variation in wheat: genetic and cytogenetic characterization of alcohol dehidrogenase I mutants. Theor. Appl. Genet., 72: 644–653.

Hagima Ioana, 1983 – Corelaţii între aneuploidie şi polimorfismul enzimatic la grâu. St. cerc. biochim., 26: 141–144.

Hagima Ioana, Ittu Gh., 1986 – Polimorfismul fosfatazei acide şi al beta-amilazei totale la unele forme de triticale. Probl. genet. teor. aplic., XVIII, 1: 41–52

Hagima Ioana, Săulescu N. N., 1987 – Compoziţia în subunităţi gluteninice a unor soiuri de grâu. St. cerc. biochim., 30, 1: 29–33.

Hart G. E., 1973 – Homologous gene evolution in hexaploid wheat. Proc. 4th Int. Wheat Genetic Symposium, Columbia, Missouri: 805–810.

Joudrier M. P., Cauderon Y., 1976 – Localisation chromosomique de genes controlant la synthèse de certains constituants beta-amylasique du grain de ble tendre, C. R. Acad. Sc. Paris, 282, 1: 115.

Joudrier M. P., Bernard M., 1977 – Responsability of the D-genome on some beta-amylases isozymes in the wheat grain. Annal. Amelior. Plant., 27: 35–47.

Scanned with OKEN Scanner

Larkin P. J., Scowcroft W. R., 1981 – Somaclonal variation – a novel source variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60: 197–217.

Larkin P. J., Ryan S. A., Brettel R. I. S., Scowcroft W. E., 1984 – Heritable somaclonal variation in wheat. Theor. Appl. Genet., 67: 443–455.

Lookhart G. L., Hagman K., Kasarda D. D., 1993 – High molecular weight glutenin subunits of the most commonly grown wheat cultivars in the U. S. in 1984. Plant. Breed., 110: 48–62.

Maddock S. E., Disiolt R., Parmar S., Jones M. G. K., Shewry P. R., 1985 – Somaclonal variation in the gliadin patterns of grains of regenerated wheat plants. J. Exp. Bot., 36: 1976–1984.

Maddock S. E., Semple J. T., 1986 – Field assesment of somaclonal variation in wheat. J. Exp. Bot., 37: 1065–1078.

Murashige T., Skoog F., 1962 – A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473–497.

Nevo E., Nishikawa K., Furuta Y., Gonokami Y., 1993 – Genetic polymorphism of alfa and beta-amylase isozymes in wild emmer wheat *Triticum dicocoides,* in Israel. Theor. Appl. Genet., 85: 1029–1042.

Payne P. I., Lawrence G. J., 1983 – Cataloque of allels for the complex gene loci, Glu-A 1, Glu-B 1 and Glu-D 1 which code for HMW subunits of glutenin in hexaploid wheat. Cereal res. Comm., 11: 29–35.

Ribalka A. I., Sozinov A. A., 1980 – Genetic study of grain beta-amylase in common wheat. Genetika, 26: 1059–1062.

Ryan S. A., Scowcroft W. R., 1987 – A somaclonal variant of wheat with additional beta-amylase isozymes. Theor. Appl. Genet., 73: 459–464.

Sharp P. J., Desai S., Chao S., 1988 – Isolation, characterization of a set of 14 RFLP probes identifying each homoeologus chromosome arm in the *Triticeae.* 7th Int. Wheat Genet. Symp., vol. I: 639–646.

Torres A. M., 1976 – Genetic control of acid phosphatase. Can. J. Genet. Cytol., 18: 709–716.

Scanned with OKEN Scanner

CERCET. GENET. VEGET. ANIM., VOL. IV, 1996

Scanned with OKEN Scanner

IDENTIFICAREA CROMOZOMILOR IMPLICAȚI ÎN EREDITATEA DIMENSIUNILOR BOABELOR LA UN GENOTIP DE GRÂU CU BOABE MARI

A. GIURA, N. N. SĂULESCU

Mărimea boabelor este componentul de producție cu cea mai mare stabilitate fenotipică. În același timp, mărimea și forma boabelor influențează randamentul de făină, fiind astfel un component al calității de morărit. De aceea, mărimea și forma boabelor se numără printre obiectivele multor programe de ameliorare. Informațiile asupra determinismului genetic al dimensiunilor bobului pot contribui la creșterea eficienței acestor programe de ameliorare.

Law (1968), Snape și colab. (1985), precum și Petrovic și Worland (1988) au publicat rezultate privind localizarea cromozomală a genelor care afectează greutatea bobului. În toate aceste studii însă, diferențele între părinți privind mărimea boabelor au fost relativ reduse. De asemenea, nici unul dintre autorii mai sus citați nu a comunicat și date asupra localizării genelor care controlează dimensiunile boabelor.

Prezenta lucrare comunică rezultatele obținute privitor la cromozomii implicați în controlul genetic al mărimii boabelor și al componentelor acesteia la un genotip de grâu creat la Laboratorul de genetică a grâului din I.C.C.P.T. Fundulea și caracterizat printr-o masă a 1 000 de boabe (MMB) foarte ridicată.

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

Genotipul de grâu utilizat ca sursă de gene pentru mărimea boabelor a fost G 603–86, o linie selectată din încrucișarea Cologna/F 6–75, unde Cologna este o populație originară din Italia, caracterizată prin boabe foarte lungi, iar F 6–75 este o linie semipitică, selectată la Fundulea din hibridul Mexique 50/B 21/Aurora. G 693–86 a înregistrat, în majoritatea anilor, la Fundulea, o masă a 1 000 boabe de peste 60 g, în timp ce majoritatea grânelor au MMB cuprinsă între 35 și 45 g. Această MMB ridicată a liniei G 603–86 este asociată cu o lungime mare a bobului,

care variază, în cele mai multe condiţii, între 8,5 şi 9 mm, faţă de 6–7 mm la majoritatea grânelor.

Pentru identificarea cromozomilor implicaţi în determinismul mărimii boabelor la linia G 603–86, aceasta a fost încrucişată în anul 1987 cu cele 21 linii monosomice ale soiului Favorit, obţinute anterior la I.C.C.P.T. Fundulea (Giura, 1990). Plantele monosomice F_1 au fost selectate citologic, iar generaţiile F_1 şi F_2 au fost cultivate în câmp, în condiţii de izolare. Din descendenţa fiecărei populaţii F_2 au fost extraşi câte trei disomi F_3 care au fost cultivaţi în câmp pentru înmulţire. Descendenţele tuturor disomilor F_3 au fost incluse în anul 1991, alături de formele parentale G 603–86 (P_1) şi Favorit (P_2), într-o cultură comparativă cu trei repetiţii. MMB a fost determinată împărţind greutatea obţinută prin cântărirea boabelor din spicele principale la numărul total al boabelor şi înmulţind rezultatul cu 1 000. Lungimea şi grosimea boabelor au fost determinate prin măsurarea cu micrometrul a 90 boabe din fiecare descendenţă. Diferenţele în densitatea şi forma boabelor au fost exprimate prin calcularea unei mărimi denumite „factor formă-densitate" folosind formula:

Factor formă-densitate = MMB/(lungimea bobului × grosimea bobului).

Datele au fos supuse analizei varianţei, stabilindu-se apoi semnificaţia abaterilor faţă de media experienţei.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analiza varianţei evidenţiază diferenţe semnificative între genotipurile experimentate, atât pentru MMB, cât şi toate componentele sale, deşi cele două forme parentale utilizate pentru studiu diferă semnificativ numai pentru MMB şi lungimea bobului (tabelul 1). Se poate presupune că recombinarea genelor din cromozomii nesubstituiţi a produs noi interacţiuni cu cromozomii substituiţi, ceea ce a permis manifestarea unei variabilităţi genetice, care nu era evidentă la formele parentale.

Valoarea medie a tuturor descendenţelor disomilor a fost semnificativ inferioară mediei formelor parentale pentru MMB şi pentru grosimea boabelor, ceea ce reflectă un nivel mai ridicat de şiştăvire la descendenţe decât la părinţi. În schimb, pentru lungimea boabelor şi pentru factorul formă-densitate, media descendenţelor nu a fost semnificativ diferită de media formelor parentale.

Analiza varianţei identifică diferenţe semnificative între grupele homeoloage pentru toate însuşirile studiate, dar diferenţele între genomuri nu sunt semnificative. Interacţiunile dintre grupele homeoloage şi genomuri apar semnificative numai pentru MMB şi lungimea bobului, ceea ce demonstrează că între cromozomii aparţinând aceluiaşi grup există diferenţe în efectul lor asupra acestor însuşiri.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Analiza varianței (valorile F) pentru caracteristicile boabelor la descendențele disomilor F_3 extrași din încrucișarea monosomilor soiului Favorit cu linia G 603–86

(ANOVA, F – values for grain characters of F_3 disomics progenies from the cross between Favorit monosomics and line G 603–86)

Sursa variabilității (Variation source)	GL (DF)	Masa a 1 000 boabe (Thousand grain weight)	Lungimea bobului (Grain length)	Grosimea bobului (Grain width)	Factorul formă-densitate (Form-density factor)
Totală	22	3,87**	14,72**	3,52**	2,38**
Între părinți	1	33,73**	218,87**	0,07	0,00
Între părinți și descendențele disomilor F_3	1	4,15*	0,53	38,75**	6,34
Între descendențele disomilor F_3	20	2,36**	5,22**	1,93	2,33**
Grupe homeoloage	(6)	3,74**	7,94**	3,43**	4,98**
Genomuri	(2)	0,69	0,11	0,33	2,47
Grupe × genomuri	(12)	1,95*	4,68**	1,45	1,01

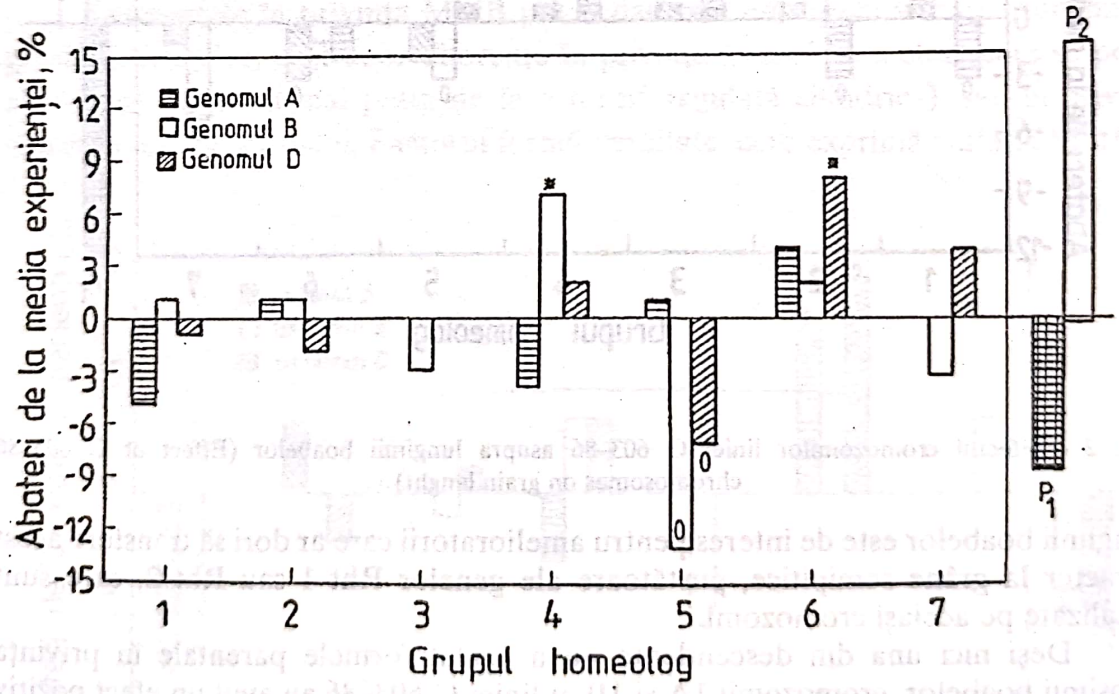


Fig. 1 – Efectul cromozomilor liniei G 603–86 asupra masei a 1 000 boabe (Effect of G 603–86 chromosomes on grain weight)

Masa a 1 000 boabe a fost semnificativ mărită în prezenţa cromozomilor 6D şi 4B ai liniei G 603–86, dar semnificativ redusă de cromozomii 5B şi 5D ai aceleiaşi linii (fig. 1). Cu excepţia cromozomului 5D, care a fost identificat de Petrovic şi Worland (1988) ca fiind implicat în controlul diferenţei de greutate a boabelor între soiurile Bersée şi Sava, nici unul din cromozomii care au fost asociaţi cu variaţii ale MMB în studiul nostru nu a fost descris anterior ca purtând gene care controlează mărimea boabelor. Aceasta demonstrează specificitatea genotipului cu boabe mari utilizat de noi, din punct de vedere al controlului genetic al MMB.

Lungimea boabelor a fost influenţată semnificativ pozitiv de cromozomii 4B, 4A, 2B, 3A şi 1B şi negativ de cromozomii 7B, 5B şi 1A ai liniei G 603–86 (fig. 2). Aceste diferenţe în lungimea boabelor sunt asociate cu diferenţe asemănătoare în privinţa MMB, doar în cazul cromozomilor 4B şi 5B. Evident, în cazul celorlalţi cromozomi, creşterea lungimii boabelor este compensată de o descreştere a altor componente ale MMB. Implicarea cromozomilor 4A şi 4B în controlul genetic al

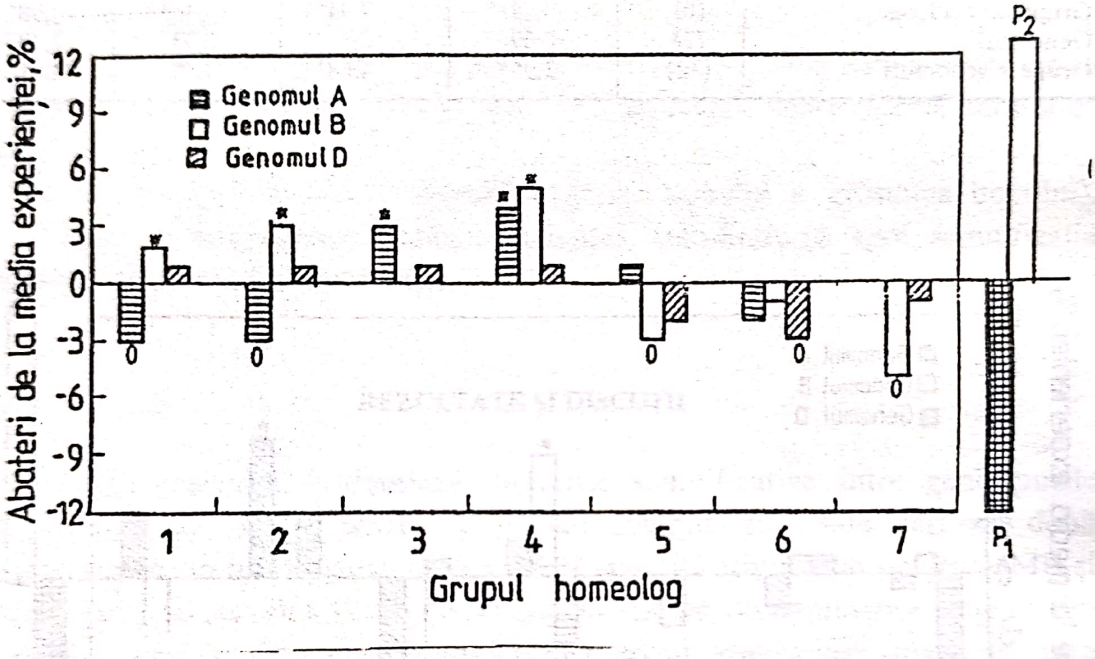


Fig. 2 – Efectul cromozomilor liniei G 603–86 asupra lungimii boabelor (Effect of G 603–86 chromosomes on grain lenght)

lungimii boabelor este de interes pentru amelioratorii care ar dori să transfere acest caracter la grâne semipitice, purtătoare ale genelor Rht 1 sau Rht 2, care sunt localizate pe aceiaşi cromozomi.

Deşi nici una din descendenţe nu a egalat formele parentale în privinţa grosimii boabelor, cromozomii 1A şi 1B ai liniei G 603–86 au avut un efect pozitiv asupra acestei însuşiri, fiind asociaţi cu o diferenţă pozitivă semnificativă faţă de media experienţei (fig. 3). Cromozomii 5D şi 4A au fost asociaţi cu o grosime a boabelor semnificativ inferioară mediei. Şiştăvirea mai accentuată la descendenţele purtătoare ale cromozomului 5D al liniei F 603–86 este explicaţia MMB scăzute asociate prezenţei acestui cromozom, în timp ce în cazul cromozomului 4A, şiştăvirea mai pronunţată pare a fi cauza pentru care creşterea lungimii bobului nu se reflectă într-o greutate sporită a boabelor.

Scanned with OKEN Scanner

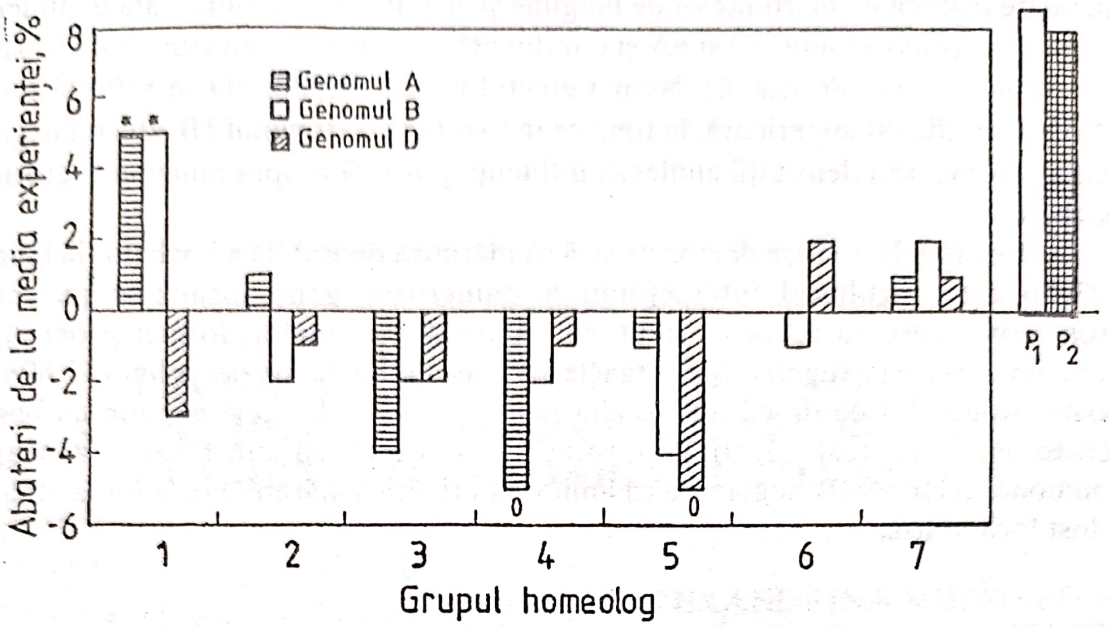


Fig. 3 – Efectul cromozomilor liniei G 603–86 asupra grosimii boabelor (Effect of G 603–86 chromosomes on grain width)

Diferențele în privința MMB pot fi datorate nu numai variației lungimii și grosimii boabelor, ci și unor diferențe în privința formei boabelor (care se poate abate mai mult sau mai puțin de la o formă regulată cilindrică), sau în privința densității endospermului. Factorul formă-densitate, care exprimă variația MMB ce

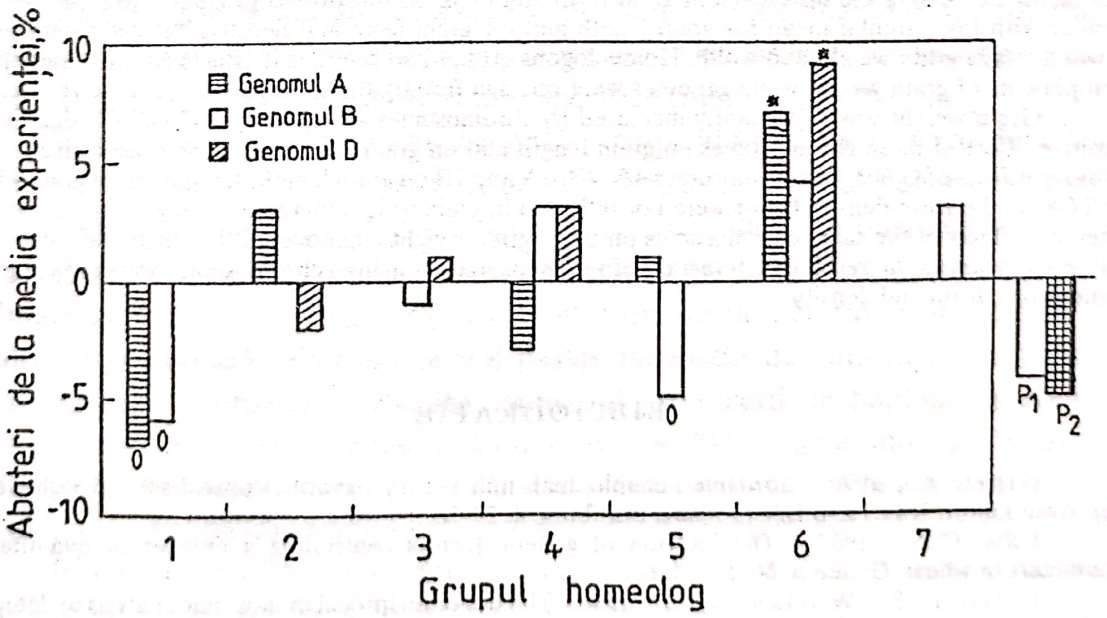


Fig. 4 – Efectul cromozomilor liniei G 603–86 asupra factorului formă-densitate (Effect of G 603–86 chromosomes on the factor form-density)

nu poate fi atribuită diferenţelor de lungime şi grosime a boabelor, arată o influenţă pozitivă a cromozomilor 6D şi 6A şi o influenţă negativă a cromozomilor 1A, 1B şi 5B ai liniei G 603–86 (fig. 4). Numai efectul cromozomului 6D se reflectă într-o MMB semnificativ superioară, în timp ce în cazul cromozomului 1B, efectul negativ asupra formei sau densităţii anulează influenţa pozitivă asupra lungimii şi grosimii boabelor.

Rezultatele noastre demonstrează că mărimea deosebită a boabelor la linia G 603–86 este rezultatul interacţiunii a numeroase gene localizate pe mulţi cromozomi, care au influenţe multiple asupra dimensiunilor, formei şi densităţii boabelor. Aceasta sugerează că transferul mărimii boabelor de la linia G 603–86 poate fi deosebit de dificil. Pe de altă parte, faptul că la acest genotip cu boabe foarte mari au fost identificaţi totuşi cromozomi cu efect negativ asupra componentelor MMB, sugerează că limita superioară a mărimii boabelor la grâu nu a fost încă atinsă.

IDENTIFICATION OF CHROMOSOMES INVOLVED IN CONTROLLING THE LARGE GRAIN SIZE OF A WHEAT GENOTYPE

SUMMARY

The objective of this study was to identify the chromosomes associated with the very large grains of the wheat line G 603–86, bred at ICCPT Fundulea. G 603–86 has an average grain weight over 60 mg and a grain length of about 9 mm. F_3 lines extracted from F_2 populations obtained from F_1 monosomics of crosses between G 603–86 (P_1) and the monosomics set of Favorit (P_2) were field tested, and grain weight and its components were determined.

Parents were significantly different for grain weight and grain length, but not for grain width or the factor expressing the difference in grain form and density. Substituted progenies were in average similar with the parental mean for grain length and for grain form and density, but had significantly lower average grain weight and width. Homeologous groups had significant effects on grain and on all components of grain weight while genomes were not significantly different for any of these characters.

Grain weight was significantly increased by chromosomes 4B and 6D of G 603–86, due to the positive effect of these chromosomes on grain length and on grain form and density respectively. The positive effects of G 603–86 chromosomes 4A, 2B, 3A and 1B on grain length, 1A and 1B on grain width and 6A on the form-density factor were not reflected in grain weight increases, being compensated by negative effects of the same chromosomes on other grain weight components. The high grain size in G 603–86 appears as the result of interaction of genes located on manny chromosomes which affect grain dimensions, form and density.

BIBLIOGRAFIE

Giura A., 1990 – Sozdanie aneuploidnâh linii pşeniţî Favorit. Voprosî selekţii i ghenetiki zernovâh kultur. K.O.Tz.–S.E.V., I.I.Z.K. Bernburg, 4: 29–38.

Law C.N., 1967 – The location of genetic factors controlling a number of quantitative characters in wheat. Genetics, 56: 445–461.

Petrovic S., Worland A. J., 1988 – The use of reciprocal monosomic analysis to detected variation between certain chromosomes of the wheat varieties Bersee and Sava. Proc. 7th Int. Wheat Genetics Symp. Cambridge, England: 629–633.

Snape J. W., Law C. N., Parker B. B., Worland A. J., 1985 – Genetical analysis of chromosome 5A of wheat and its influence on important agronomic characters. Theor. Appl. Genet., 71: 518–526.

Scanned with OKEN Scanner

PROGRESE ÎN OBȚINEREA DE HAPLOIZI ȘI LINII HOMOZIGOTE DUBLU HAPLOIDE (DH) LA ORZUL ȘI ORZOAICA DE TOAMNĂ

ALEXANDRINA MIHĂILESCU,
A. GIURA, AL. BUDE *

În prezent, la numeroase specii de cultură, printre care și orzul, se realizează progrese însemnate în lucrările de creare de soiuri prin utilizarea de metode neconvenționale, biotehnologice care permit, printre altele, homozigotarea rapidă și controlată a materialului hibrid și scurtarea duratei programelor de ameliorare cu 5–6 ani (Mihăilescu, 1978, 1980; Mihăilescu și colab., 1993; Giura și Mihăilescu, 1993).

Dintre procedeele biotehnologice de inducere de haploizi și linii dublu haploide (DH) la orz, cele mai aplicate sunt cele bazate pe androgeneză și eliminarea de genoame în hibridări interspecifice (metoda „*bulbosum*").

În metodele bazate pe androgeneză – respectiv cultura *in vitro* de antere, polen sau microspori – regeneranții își au originea în nucleul generativ (ng), în nucleul vegetativ (nv), într-o formațiune celulară rezultată din fuziunea celor două tipuri de nuclei sau în peretele anterei. În evoluția lor ulterioară aceste formațiuni celulare parcurg o embriogeneză directă cu formare de plăntuțe sau, de cele mai multe ori, calusează, obligând la noi pasaje pe medii de cultură ce favorizează embriogeneza și organogeneza. Randamentul producerii de haploizi la orz prin androgeneză este relativ redus, și anume, de 18–20% regeneranți la 100 antere cultivate, dintre aceștia între 40 și 80% sunt plăntuțe albinotice neviabile și produși secundari – poliploizi, aneuploizi, mutante cromozomale etc. (Jensen, 1986).

În metoda *bulbosum* al cărui principiu de bază este eliminarea selectivă a genomului de la specia sălbatică *H. bulbosum* în încrucișările interspecifice *H. vulgare* × *H. bulbosum*, regeneranții se dezvoltă direct din embrioni haploizi de tip *vulgare* cultivați *in vitro* pe mediu nutritiv special (Jensen, 1977; Pickering,

* Institutul de Cercetări pentru Cereale și Plante Tehnice, Fundulea

Scanned with OKEN Scanner

1980; Hayes şi Chen, 1989). Eficienţa maximă raportată este de 48 plăntuţe haploide la 100 flori polenizate; dintre acestea, peste 90% sunt plăntuţe verzi, viabile, lipsind produşii secundari.

Includerea metodei *bulbosum* în programele de ameliorare a orzului din numeroase ţări a dus la omologarea şi comercializarea de soiuri de orz şi orzoaică cu origine dublu haploidă: soiurile Mingo şi Rodeo în Canada (Ho şi Jones, 1980; Cambell şi colab., 1984), Doublet şi Pipkin în Anglia (Pickering, 1990) şi Gwylan în New Zeeland (Coles, 1986). Aceste soiuri au fost comercializate într-o perioadă de 7–8 ani de la hibridarea iniţială, ceea ce înseamnă o economie de timp considerabilă comparativ cu aplicarea metodelor convenţionale.

În 1991 s-a iniţiat şi la I.C.C.P.T. Fundulea un program de obţinere de haploizi şi dublu haploizi (DH) homozigoţi la orzul şi orzoaica de toamnă prin adaptarea metodei *bulbosum* la condiţii de seră şi câmp, întrucât toate fazele metodei originale au fost protocolate pentru condiţii experimentale strict controlate (Jensen, 1976, 1983; Hayes şi Chen, 1991).

Scopul cercetărilor noastre îl constituie:

- crearea de linii DH pentru scurtarea duratei programelor de ameliorare a orzului şi orzoaicei de toamnă şi uniformizarea produşilor finali de ameliorare;
- testarea germoplasmei autohtone pentru compatibilitatea la încrucişarea cu *H. bulbosum* şi pentru capacitatea de inducere de haploizi;
- proiectarea şi construirea de stocuri genetice (linii DH) pentru cercetări moderne de genetică moleculară.

În această lucrare prezentăm progresele realizate în patru cicluri de inducere de haploizi şi de linii dublu haploide (1991–1994) în urma adaptării şi îmbunătăţirii metodei *bulbosum* pentru condiţii de seră şi câmp.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Materialul biologic utilizat a fost reprezentat de 57 genotipuri de orz şi orzoaică de toamnă ca forme materne şi de trei citotipuri de *H. bulbosum* ca forme paterne, genotipurile de orz aparţinând la diferite generaţii de ameliorare: F_1, F_3 şi F_4, linii şi soiuri în cultură (tabelul 1).

Metoda *bulbosum* originală a fost modificată pentru condiţii de seră şi câmp în principalele sale etape de lucru:

- stabilirea parametrilor necesari pentru sincronizarea înspicatului şi înfloritului speciilor parentale;
- realizarea hibridărilor *H. vulgare* × *H. bulbosum* în condiţii experimentale variabile;
- aplicarea *in vivo* de tratamente hormonale combinate (GA_3 + 2,4-D);
- identificarea de medii nutritive artificiale cu randament superior la germinarea embrionilor haploizi şi regenerarea de plăntuţe;
- parcurgerea ciclurilor de clonare naturală înaintea tratamentelor de restabilire a fertilităţii haploizilor prin dublarea numărului de cromozomi.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Materialul biologic utilizat
(The genotypes used in the crossing programmes)

1991 5 genotipuri orzoaică (hibrizi F_1)		1991 2 citotipuri de H. bulbosum 2n = 2x = 14
1992 11 genotipuri: 1 orz 10 orzoaică (9 hibrizi F_4 + 2 linii)		1992 2 citotipuri de H. bulbosum 2n = 2x = 14 1 citotip de H. bulbosum 2n = 4x = 28
1993 18 genotipuri: 7 orz 11 orzoaică (6 hibrizi F_4 + 8 linii + 4 soiuri)	X	1993 1 citotip de H. bulbosum 2n = 2x = 14 1 citotip de H. bulbosum 2n = 4x = 28
1994 23 genotipuri: 10 orz 13 orzoaică (8 hibrizi F_4 + 6 linii + 9 soiuri)		1994 1 citotip de H. bulbosum 2n = 2x = 14

În ceea ce privește modalitățile de tratament cu hormoni de creștere post polenizare, acestea pot fi:

• tratamente simple *in vivo*, exogene cu acid giberelic (GA_3) prin pulverizarea spicului după 24, 48 sau 72 ore de la polenizare (tratamentul original, Jensen, 1976);

• tratamente combinate *in vitro* cu mai mulți hormoni de creștere (GA_3 + + 2,4-D + kinetină ș.a.) incluși în mediul nutritiv de cultură a spicelor sau florilor polenizate detașate (Chen și Hayes, 1989);

• tratamente exogene combinate, *in vivo*, cu acid giberelic (GA_3) și acid 2,4-D-diclorfenoxiacetic (2,4-D) (Mihăilesu, Giura și Bude, 1994).

Scanned with OKEN Scanner

Variantele de tratament exogen, combinat *in vivo* cu diferiţi fitohormoni şi modalităţile de aplicare în programul de la I.C.C.P.T.- Fundulea sunt sintetizate în tabelul 2.

Tabelul 2

Variante de tratament exogen, *in vivo* cu hormoni de creştere
(Combined treatments with exogenous plant growth regulators applied *in vivo*)
I.C.C.P.T. Fundulea, 1993

Varianta (Treatment)	Hormonul de creştere (PGR)	Concentraţia şi raportul volumetric V/V (Concentration and volumetric ratio V/V)	Modul de aplicare (Application)	Momentul tratamentului Ore de la polenizare (Hours after pollenization		
				24	48	72
V_1	GA_3 + 2,4-D	6 : 1 (75 ppm : 20 ppm)	a	+	+	
V_2	GA_3 + 2,4-D	6 : 1 (75 ppm : 20 ppm)	a + b	+	+	
V_3 Mt**	GA_3	75 ppm	b	+	+	+
V_4	GA_3 + 2,4-D	1 : 1 (75 ppm : 10 ppm)	a + b	+	+	
V_5	GA_3 + 2,4-D	6 : 1 (75 ppm : 20 ppm) 1 : 1 (75 ppm : 10 ppm)	a a	+	 +	
V_6	GA_3 + 2,4-D	(75 ppm : 10 ppm)	a + a	+	+	

a - pipetare în cupa florală (drop method);
b – pulverizare pe suprafaţa spicului (spraying of spike);
V_3 Mt – Metodă folosită pe plan internaţional (Currently used method) (Jensen, 1976).

Detaliile privitoare la hibridare, la recoltarea şi analiza seminţelor hibride şi a embrionilor haploizi ca şi cultura acestora *in vitro* sunt prezentate în lucrări anterioare (Mihăilescu şi colab., 1993; Giura şi Mihăilescu, 1993).

Estimarea eficienţei producerii de haploizi (HPE) prin aplicarea metodei *bulbosum* s-a făcut după formula elaborată de Hayes şi Chen (1989) în care:

$$HPE = S / F \times E / S \times P / E$$

unde:

S / F = reprezintă procentul de seminţe disecate din florile polenizate;
E / S = embrioni cultivaţi din totalul seminţelor disecate;
P / E = procentul de plăntuţe haploide regenerate din totalul embrionilor cultivaţi.

Clonarea naturală a plăntuţelor haploide de orz se efectuează înaintea tratamentelor de dublare a numărului de cromozomi în stadiul de 4–5 fraţi. Clonarea se poate aplica în două sau mai multe cicluri succesive până la realizarea volumului de material biologic dorit.

Scanned with OKEN Scanner

În stadiul de plăntuță cu 2–3 frați se aplică tratamentele de dublare a numărului de cromozomi a haploizilor după metoda Jensen (1976) (Giura și Mihăilescu, 1995).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele *in vivo* și *in vitro* ale hibridării orzului și orzoaicei de toamnă cu *H. bulbosum*

În perioada 1991–1994, s-au polenizat 19 045 flori și s-au format 10 754 semințe la 57 genotipuri de orz și orzoaică de toamnă. Capacitatea de formare de semințe (număr de semințe formate la 100 flori polenizate – SS) a avut o valoare medie de 56,4%, variind în fiecare an și la fiecare genotip lucrat (tabelul 3).

Tabelul 3

Rezultate ale hibridării orzului și orzoaicei de toamnă cu *H. bulbosum* (2n = 2x = 14)

(Seed setting and embryo formation in *H. vulgare* × *H. bulbosum* (2n = 2x = 14) crosses)

Parametri (Parameters)	1991*	1992*	1993	1994**	Total (Total)
Genotipuri (Genotypes)	5	11	18	23	57
Flori polenizate (Florets pollinated no.)	696	3017	5807	9525	19 405
Semințe formate (Seeds harvested no.)	68	1937	2998	5742	10 745
SS (semințe / flori (Seed setting), %	9,8 (0–17,6)	64,2 (12,0–96,6)	51,6 (36,2–70,1)	60,3 (42,0–80,6)	56,4
E / F (embrioni formați / flori (E / F embryos formed/florets), %	2,4	20,6	21,3	34,4	27,1
Embrioni / spic (Embryos / spike)	0,5	3,6	4,1	6,3	5,0

* – tratament hormonal simplu: GA_3 – 75 ppm

** – tratament hormonal combinat (varianta 4 din 1993 ușor modificată).

Cu rare excepții, genotipurile românești de orz și orzoaică de toamnă se încadrează în categoria genotipurilor compatibile în încrucișările cu *H. bulbosum*, cu valori mai mari de 60% pentru formarea de semințe (Pickering și colab., 1976; Pickering, 1983 a; Mihăilescu și colab., 1993). Valori medii ridicate pentru capacitatea de formare de semințe (SS) s-au obținut în anii 1992 și 1994, respectiv, 64,2% și 60,3%, însă în anul 1994 s-au întâlnit și genotipuri care au format semințe în proporție 80,6%.

Numărul de embrioni formați la 100 flori polenizate (E / F) a crescut constant la ciclurile succesive de hibridări având valoarea medie de 27,1% și valoarea

Scanned with OKEN Scanner

maximă de 34,4% în anul 1994. O aceeaşi curbă de evoluţie parcurge şi parametrul numărul de embrioni formaţi la un spic lucrat, valoarea medie fiind de 5,0 embrioni, iar cea maximă de 6,3 embrioni per spic în anul 1994.

Din totalul de 10 745 seminţe formate, numai 8 269 au fost de calitate, supuse disecţiei, procentul mediu fiind de 80,3 (tabelul 4). Din totalul embrionilor formaţi, categoria embrionilor mari şi mijlocii (cu capacitate superioară de germinare şi regenerare de plăntuţe haploide *in vitro)* are valori cuprinse între 0 şi 69,6% (1991 şi 1994), cu o medie de 60,1%. Creşterea semnificativă a valorilor acestui parametru se datorează aplicării *in vivo* a unor variante originale de tratament hormonal combinat, după cum vom arăta mai departe.

Tabelul 4

Progresul realizat în producerea de haploizi la orzul şi orzoaica de toamnă
(Progress of the haploid production in six and two-rowed winter barley)

I.C.C.P.T.-Fundulea, 1991–1994

Parametri (Parameters)	1991	1992	1993	1994	Total (Total)
Seminţe disecate (Seed dissected no.)	68	1 110	2 566	48 885	8 629
Seminţe disecate / seminţe formate (Seed dissected / harvested seed), %	100,0	57,3	85,6	85,1	80,3
Embrioni formaţi (Embryos formed no.)	17	662	1 238	3 274	5 151
Embrioni mari + mijlocii (Embryos differentiated), %	0,0	25,2	53,1	69,6	60,1
Plante haploide regenerate (Haploid plants regenerated no.)	2	102	342	300	746
P / S (plante haploide / seminţe disecate (P / S haploid plants / dissected seeds), %	2,9	9,2	13,3	6,1	8,6

În patru ani de experimentare la 57 genotipuri de orz şi orzoaică, s-au obţinut 746 plăntuţe haploide, dintre care 342 în anul 1993. În medie s-au indus 8,6 plăntuţe haploide la 100 seminţe disecate (P / S) limitele de variaţie fiind cuprinse între 2,9 şi 13,3 %.

În condiţiile variabile din seră şi câmp, în primii ani de experimentare (temperaturi ridicate în perioada hibridărilor) tratamentele simple cu GA_3 au dus la formarea în procente foarte mari de embrioni mici nediferenţiaţi (100% în 1991 şi 74,8% în 1992), cu capacitate redusă de germinare sau lipsiţi total de germinare.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5

Rezultate ale aplicării *in vivo* a unor variante de tratament hormonal combinat
(Results of the combined treatments with exogenous plant growth regulators applied *in vivo*)

I.C.C.P.T. – Fundulea, 1993

Parametri (Parameters)	V_1	V_2	V_3 (Mt.)	V_4	V_5	V_6
Flori polenizate (Florets pollinated)	1 593	341	400	898	1 590	908
Cariopse formate (Seed harvested)	688	140	159	598	1 000	398
Cariopse disecate (Seed dissected)	628	137	135	598	914	250
Embrioni formați (Embryos formed)	244	43	92	258	373	169
Embrioni mari + mijlocii (Embryos differentiated)	93	22	63	217	190	86
Embrioni cultivați (Embryos cultured)	299	35	90	245	349	161
Plante haploide (Haploid plants)	39	9	24	82	144	43

În 1993 s-a testat o grilă cu mai multe variante de tratament hormonal combinat, aplicat *in vivo*, exogen, în primele 2–3 zile după polenizare și ale căror rezultate sunt sintetizate în tabelul 5. Martorul a fost reprezentat de tratamentul simplu cu acid giberelic (GA_3), tratament stabilit și utilizat în condiții experimentale cu climat strict controlat (camere de creștere, Jensen, 1976).

În analiza datelor s-a considerat un efect direct *in vivo* asupra formării și calității cariopselor și a embrionilor și un efect indirect *in vitro* asupra capacității de germinare a diferitelor clase de embrioni și a regenerării de plăntuțe haploide.

Pe baza acestor date s-au calculat unii parametrii de estimare a efectelor variantelor de tratament combinat (tabelul 6).

Capacitatea de formare a semințelor (SS) a fost mai mare la variantele de tratament V_4 și V_5, respectiv 66,6 și 62,9% față de varianta martor (V_3), la care procentul mediu este de 39,7, același efect manifestându-se și în ce privește procentul semințelor de calitate (S/F), și anume: 66,6 și 57,5 la V_4 și V_5 față de 33,7 la V_3 (martor).

Proporția semințelor de calitate din cele formate este relativ aceeași la martor și la variantele de tratament combinat V_1, V_2,V_4 și V_5, respectiv 84,9% la martor și 91,3%, 97,9%, 100% și 91,4% la variante. Valori foarte apropiate de valoarea martor s-au obținut la variantele de tratament combinat și pentru procentul de embrioni cultivați din totalul embrionilor formați: 97,8 la V_3 și 93,8, 81,4, 95,0,93,6 și 95,3 la celelalte variante.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 6

Parametri de evaluare a efectelor directe *in vivo* şi indirecte *in vitro* ale variantelor de tratament hormonal combinat

(*In vivo* and *in vitro* effects of the combined hormonal treatments)

I.C.C.P.T. – Fundulea, 1993

Parametri (Parameters)	V_1	V_2	V_3 (Mt.)	V_4	V_5	V_6
SS (seminţe/flori) (Seed setting), %	43,2	41,1	39,7	66,6	62,9	43,8
S/F(seminţe disecate/flori) (S/F seeds disseçted/florets), %	39,4	40,2	33,7	66,6	57,5	27,5
Seminţe disecate/seminţe formate (Seed dissected/harvested seeds), %	91,3	97,9	84,9	100,0	91,4	62,8
Embrioni cultivaţi/embrioni formaţi (Embryos cultured/developed embryos), %	93,8	81,4	97,8	95,0	93,6	95,3
Embrioni mari şi mijlocii cultivaţi (Embryos differentiated),%	40,6	51,4	68,9	88,6	52,2	53,4
Embrioni germinaţi/embrioni cultivaţi (Embryos germinated/cultured embryos), %	44,5	65,7	74,4	72,7	61,6	33,5
P/E (plante haploide/embrioni cultivaţi) (P/E haploid plants/cultured embryos), %	17,0	25,7	26,7	33,5	41,3	26,7
P/F (plante haploide/flori polenizate) (P/F haploid plants/pollinated florets), %	2,4	2,6	6,0	9,2	9,0	4,7

Categoria embrionilor mari şi mijlocii (cu capacitate bună de germinare şi regenerare de plăntuţe haploide *in vitro)* are valori procentuale mai mari la V_4,faţă de varianta martor, şi anume: 88,6 faţă de 68,9.

Variantele de tratament V_4 şi V_5 se disting faţă de martor prin valori crescute şi pentru parametrii P/E (plante haploide regenerate la 100 embrioni cultivaţi) şi P/F (plante haploide regenerate la 100 flori polenizate), respectiv 33,5 şi 41,3% faţă de 26,7% pentru P/E şi de 9,2% şi 9,0% faţă de 6,0% pentru P/F.

Rezultatele prezentate arată că variantele originale de tratament combinat V_4 şi V_5 testate în condiţii de seră şi câmp au determinat modificări însemnate ale parametrilor analizaţi, valorile acestora fiind superioare variantei martor (V_3) aplicată în condiţii experimentale cu climat controlat.

Devaux (1991) menţionează că în încrucişările *H. vulgare* × *H. bulbosum,* la temperaturi prea ridicate, tratamentele repetate cu GA_3 favorizează apariţia de embrioni haploizi deformaţi, incapabili de regenerare *in vitro* şi recomandă pentru astfel de perioade, aplicarea unui singur tratament cu GA_3.

Scanned with OKEN Scanner

Chen și Hayes (1991) studiază efectele individuale și combinate a trei hormoni de creștere (2,4-D, GA_3 și kinetina) incluși în mediile nutritive artificiale pentru cultura *in vitro* de flori polenizate detașate în cadrul hibridărilor *H. vulgare* × *H. bulbosum*. Testările arată că hormonul de creștere 2,4-D singur sau în combinație cu kinetina, ar putea fi recomandat pentru mărirea randamentului culturii *in vitro* de flori polenizate, ca etapă suplimentară în protocolul metodei *bulbosum*.

Eficiența producerii de haploizi (HPE) și parametrii componenți

Indicele eficienței producerii de haploizi (HPE) este dat de produsul a trei parametri componenți: S/F (numărul de semințe disecate la 100 flori polenizate) × E/S (numărul de embrioni cultivați la 100 semințe disecate) × P/E (numărul de plăntuțe haploide la 100 embrioni cultivați) (Hayes și Chen, 1989: Mihăilescu și colab., 1993).

În cele patru cicluri de experimentare s-au realizat progrese semnificative pentru unii din parametrii componenți ai indicelui eficienței producerii de haploizi (HPE), datorate în ultimele două cicluri aplicării de tratamente hormonale combinate (tabelul 7).

Valoarea pentru parametrul S/F a fost minimă în 1991, de numai 9,8%, și maximă în 1994 – de 51,3%, cu o creștere semnificativă și în 1993, când a fost de 44,2%.

Tabelul 7

Compararea parametrilor componenți ai indicelui eficienței producerii de haploizi (HPE) la orz în diferite programe de cercetare

(Comparison between the parameters of haploid production efficiency (HPE) in barley by *bulbosum* method)

Parametri (Parameters)	România*				Franța**	U.S.A.***
	1991	1992	1993	1994	1992	1989
S/F semințe disecate/ 100 flori polenizate (S/F dissected seeds/ 100 florets pollinated)	9,8 (0–17,6)	36,8 (11,1–56,2)	44,2 (24,6–67,6)	51,3 (12,5–71,0)	44,4 (12,5–71,0)	62,6 (51,0–74,7)
E/S embrioni cultivați/ 100 semințe disecate (E/S embryos cultivated/ 100 dissected seeds)	25,0 (16,7–29,4)	38,4 (23,0–73,0)	43,3 (9,8–80,5)	43,8 (24,8–66,7)	21,0 (16,0–27,3)	54,6 (23,1–82,3)
P/E plante haploide/ 100 embrioni cultivați (P/E haploid plants/ 100 cultured embryos)	11,8 (0–18,2)	23,9 (9,0–40,0)	30,8 (2,0–52,4)	14,0 (2,5–19,9)	69,6 (58,0–85,2)	68,0 (57,0–79,0)
HPE eficiența producerii de haploizi (HPE – haploid production efficiency	0,3 (0,5–1,0)	3,4 (0–22,2)	6,0 (0,9–14,7)	3,2 (0,9–7,0)	6,9 (1,2–10,5)	25,2 (5,9–47,8

* orz și orzoaică de toamnă, condiții variabile (seră, câmp)
** orzoaică de primăvară, condiții strict controlate
*** orz de toamnă, condiții strict controlate, cultură *in vitro* de frați și flori detașate

Parametrul E/S (procentul de embrioni cultivaţi din seminţele disecate) înregistrează de asemenea o mărire semnificativă în experienţele din 1993 şi 1994 faţă de 1991, respectiv 43,3 şi 43,8% faţă de 25,0%.

Numărul de plăntuţe haploide regenerate la 100 embrioni cultivaţi (P/E) manifestă o creştere constantă în anii succesivi de experimentare, respectiv de la 11,8% în 1991 la 30,8% în 1993.

În 1994, datorită temperaturilor foarte ridicate din perioada culturii de embrioni recoltaţi din hibridările efectuate în câmp, s-au înregistrat procente ridicate de embrioni negerminaţi şi infectaţi, ceea ce a dus la reducerea drastică a numărului de plăntuţe regenerate *in vitro,* respectiv 14,0%.

Indicele eficienţei producerii de haploizi (HPE), sau randamentul real al aplicării metodei *bulbosum* la orz se situează în experienţele noastre la niveluri încă reduse, comparativ cu valorile obţinute pe plan mondial (respectiv 6,0% faţă de 6,9 şi 25,2%).

În 1993 s-a obţinut cel mai mare număr de plante haploide, indicele HPE fiind 6,0%. Din motivele expuse mai sus, rezultatele anului 1994 (în ciuda faptului că procentul de embrioni mari şi mijlocii a fost cel mai mare, de 69,6%) sunt inferioare anului 1993, HPE fiind de numai 3,2%.

În vederea stabilirii volumului optim de material biologic implicat în hibridările *H. vulgare* × *H. bulbosum* pentru obţinerea unui număr suficient de haploizi şi linii dublu haploide (DH) pentru fiecare combinaţie, s-a calculat şi eficienţa per spic a unor parametri componenţi ai capacităţii de inducere de haploizi.

Analiza datelor din 1993 arată o eficienţă mai mare (exprimată în diferenţe procentuale brute) a genotipurilor de orzoaică de toamnă faţă de orzul de toamnă în privinţa producerii de haploizi (tabelul 8).

Tabelul 8

Eficienţa per spic a unor componente ale capacităţii de producere de haploizi la orz şi orzoaică
(Spike randament of some components of the haploid production in six and two-rowed winter barley)

I.C.C.P.T. – Fundulea, 1993

Parametri (Parameters)	Orz (Six-rowed barley)	Orzoaică (Two-rowed barley)	Diferenţe orz/orzoaică (Differences six-rowed/ two rowed barley)
Genotipuri (Genotypes)	7	11	
Spice lucrate (Spikes pollinated)	139	164	
Flori polenizate (Florets pollinated)	17,4 (15,7–21,0)	20,6 (16,0–25,9)	+ 3,2
Seminţe obţinute (Seeds harvested)	8,3 (5,7–13,3)	11,2 (8,3–13,6)	+2,9
Embrioni formaţi mari şi mijlocii (Embryos formed differentiated)	3,1 (1,3–6.6) 1,3 (0,7–2,2)	5,0 (1,5–7,9) 3,0(0,3–5,9)	+ 1,9 + 1,7
Plante haploide regenerate (Haploid plants regenerated)	0,5 (0,3–1,3)	1,6 (0,3–3,2)	+ 1,1

Numărul de flori polenizate per spic este mai mare cu 3,2 flori la orzoaica de toamnă faţă de orz, al seminţelor şi embrionilor formaţi cu 2,9 şi respectiv 1,9 şi al categoriei de embrioni mari şi mijlocii cu 1,7.

La genotipurile de orzoaică de toamnă s-au indus 1,6 haploizi per spic faţă de numai 0,5 la orzul de toamnă. După aceste rezultate preliminare se preconizează, în general, efectuarea unui număr mai mare de hibridări pentru combinaţiile cu orz de toamnă.

Diferenţa în randamentul de inducere de haploizi între formele de primăvară şi cele de toamnă de orz şi orzoaică au fost semnalate de la începutul aplicării metodei *bulbosum*, (Devaux, 1987; Devaux şi colab., 1990; Jenson, 1977; Pickering, 1983 a, b, c; Thorn şi colab., 1985).

Pickering (1976 a, 1983 b) distinge în cadrul genotipurilor de orzoaică de primăvară două categorii, după capacitatea de încrucişare cu *H. bulbosum* exprimată în procentul de seminţe formate şi anume: genotipuri compatibile, cu procent de seminţe formate mai mare de 60 şi genotipuri parţial incompatibile cu garnitura de seminţe mai mică de 30%. În ce priveşte influenţa diferitelor genotipuri de *H. vulgare* şi *H. bulbosum* asupra eficienţei inducerii de haploizi aceasta este prezentă în aproape toate stadiile experimentale, după cum urmează: genotipul matern influenţează semnificativ formarea de seminţe, calitatea lor (seminţe supuse disecţiei), gradul de diferenţiere şi germinarea *in vitro* a embrionilor şi capacitatea de dublare a numărului de cromozomi. Genotipurile paterne îşi manifestă influenţa numai asupra formării seminţelor şi a diferenţierii şi germinării embrionilor (Pickering, 1983 a).

În experienţele noastre s-a manifestat, de asemenea, o mare variabilitate între genotipurile de orz şi orzoaică de toamnă ca şi între cele două citotipuri de *H. bulbosum*, în ce priveşte parametrii amintiţi (Mihăilescu şi colab., 1993).

La orzul de toamnă sunt comunicate cele mai mici randamente în obţinerea de haploizi explicate prin existenţa unui control genetic asupra capacităţii de încrucişare cu *H. bulbosum* (Devaux, 1991; Thorn şi colab., 1985).

Fără a realiza cercetări speciale pentru elucidarea acestui aspect, considerăm că diferenţele relative existente între genotipurile de orzoaică de toamnă şi orz de toamnă, în ce priveşte eficienţa producerii de haploizi, se datoresc şi tipului morfologic al spicului care determină un stres fiziologic mai accentuat în cazul spicului cu şase rânduri, supus unor traume mecanice mai drastice în timpul castrării.

Comparând valorile parametrilor componenţi ai indicelui eficienţei producerii de haploizi (HPE) obţinute la I.C.C.P.T. Fundulea şi în alte centre de cercetare, constatăm diferenţe negative mari pentru datele noastre numai la parametrii din etapele de cultură *in vitro* a embrionilor şi de regenerare a plăntuţelor haploide, respectiv P/E şi HPE (tabelul 7). Mărirea în continuare a proporţiei de embrioni mari şi mijlocii cu capacitate de germinare bună, testarea de noi medii nutritive pentru cultura *in vitro* a embrionilor haploizi ca şi evitarea unor accidente nefaste (infecţii în cultura *in vitro*) vor îmbunătăţii, cu siguranţă, valorile şi pentru aceşti parametri.

Scanned with OKEN Scanner

Obţinerea de linii dublu haploide (DH)

Un grup de 48 plante haploide (1992 şi 1993) au parcurs două cicluri de clonare în urma cărora s-au obţinut 200 clone, păstrându-se opt plante neclonate în vederea tratamentelor cu colchicină pentru dublarea numărului de cromozomi şi restabilirea fertilităţii (tabelul 9).

Tabelul 9

Rezultate ale clonării şi dublării numărului de cromozomi la haploizii de orz şi orzoaică
(Results of the cloning and chromosome doubling of the winter barley haploids)

I.C.C.P.T. – Fundulea 1992, 1993

Parametri (Parameters)	Plante clonate (Cloned plants)	Plante neclonate (Uncloned plants)	Total (Total)
Plante haploide tratate (Haploid plants treated)	40 (200 clone)	8	48
Plante cu seminţe DH (Plant with DH seeds)	36	6	42
Seminţe DH/clonă/plantă (Seeds/clone/plant)	208	104	
Randamentul dubiării (Doubling rate),%	90,0	75,0	87,5

Din cele 48 de plante colchicinizate, 42 au format spice cu seminţe dublu haploide. Numărul maxim de seminţe dublu haploide a fost de 208 per clonă tratată şi de 104 seminţe per plantă neclonată. Randamentul dublării a fost în medie de 87,5% fiind de 75,0% la plantele neclonate şi de 90,0% la plantele clonate.

Nivelul de fertilitate realizat în urma dublării numărului de cromozomi la haploizii de orz şi orzoaică a fost analizat la un număr total de 3 852 spice (tabelul 10). Spicele fertile au reprezentat, în medie, 13,8%, cu limite de variaţie foarte mari per

Tabelul 10

Nivelul de fertilitate în urma dublării numărului de cromozomi la haploizii de orz şi orzoaică
(Restored fertility level after chromosome doubling of the winter barley haploids)

I.C.C.P.T. – Fundulea 1992, 1993

Spice analizate (Observed spikes)	3852
Spice fertile (Fertile spikes), %	13,8 (3,2–81,1)
Boabe/spic fertil (Seeds/fertil spike)	9,6 (7,1–15,1)
Boabe/plantă neclonată (Seeds/uncloned plant)	39,0 (8,0–104,0)
Boabe/clonă dublată (Seeds/doubled clone)	25,3 (10,0–93,0)
Boabe/plantă clonată (Seeds/cloned plant)	107,8(25,0–465,0)

Scanned with OKEN Scanner

plantă sau clonă tratată (3,2–81,1%). Numărul mediu de boabe per spic fertil a fost de 9,6; numărul mediu de boabe per plantă neclonată a fost de 39,0, iar per plantă clonată – de aproape trei ori mai mare, respectiv 107,8. Numărul maxim de semințe per plantă neclonată a fost de 104,0, iar per plantă clonată de 465,0 semințe.

Pickering (1983) obține randamente diferite de dublare a numărului de cromozomi la haploizii aparținând la cinci soiuri de orzoaică de primăvară, cuprinse între 65,2 și 97,7%, numărul mediu de semințe per plantă haploidă neclonată variind între 19,5 și 41,0.

În programul de la I.C.C.P.T. – Fundulea, prin realizarea ciclurilor de clonare s-a evitat riscul pierderii de plante haploide în urma tratamentului cu colchicină dar, mai ales, s-a mărit substanțial cantitatea de semințe dublu haploide obținute per plantă haploidă tratată (număr mediu 107,8, maxim 465,0%).

Semințele dublu haploide formate per plantă/clonă supusă colchicinizării reprezintă generația H_0 care este urmată de două generații de multiplicare (H_1 și H_2) înainte de a fi incluse în testările din câmp. La I.C.C.P.T. Fundulea, în prezent, există două linii de orzoaică de toamnă DHL_1 și DHL_2 incluse în culturi comparative, 83 linii dublu haploide în generațiile de multiplicare H_1 și H_2, 61 dublu haploizi în generația H_0 și mai mult de 300 clone haploide pentru tratamentul de dublare a numărului de cromozomi.

CONCLUZII

▼ Metoda biotehnologică *bulbosum* pentru obținerea de haploizi și linii dublu haploide (DH) la orz și orzoaică constituie o alternativă eficientă de scurtare a perioadei de homozigotare a materialului hibrid și de uniformizare a produșilor finali în programele de ameliorare.

▼ Germoplasma autohtonă cultivată de orz și orzoaică de toamnă se încadrează în categoria genotipurilor compatibile din punct de vedere al capacității de încrucișare cu *H. bulbosum* (formare de semințe > 60%).

▼ Aplicarea de tratamente hormonale combinate *originale* a dus la mărirea indicelui eficienței produceri de haploizi (3,4% în 1992 și 6,0 în 1993).

▼ Progrese constante s-au înregistrat în perioada 1991–1994 la parametrii S/F (9,8%–51,3%); E/F (2,4%–34,7%), numărul de embrioni mari și mijlocii la 100 de embrioni formați (0%–69,6%) și eficiența per spic a embrionilor formați și cultivați (0,5–6,3 și, respectiv, 0,5–4,1).

▼ Rezultatele obținute în patru cicluri de hibridare în seră și câmp sugerează posibile perfecționări ale metodei *bulbosum* în special în etapa culturii *in vitro* a embrionilor haploizi și a regenerării de plăntuțe haploide.

▼ Îmbunătățirea metodei de dublare a numărului de cromozomi și realizarea ciclurilor de clonare au dus la creșterea randamentului de dihaploidizare (> 90%) și la evitarea pierderii de plante la colchicinizare.

Scanned with OKEN Scanner

PROGRESS OF HAPLOID AND DOUBLED HAPLOID PRODUCTION IN WINTER BARLEY

SUMMARY

In order to reduce the length of time required to breed and market new cultivars of barley, the *bulbosum* method, one of the biotechnological procedures, has been widely adopted.

A programme for releasing haploids and doubled haploids (DH) in two and six-rowed winter barley has been started at Research Institute for Cereals and Industrial Crops-Fundulea in 1991 by adapting to green house and field conditions the original *bulbosum* method.

The results obtained during the four years of experiment showed a constant progress concerning the following parameters: seed set (SS) from 9.8 to 60.3%; disected seeds from total seed setting from 57,3% in 1992 to 85.1% in 1994; cultivated embryos from pollinated florets (E/F) from 2.4 to 34.4%; differentiated embryos (big and medium sizes) from total embryos from 0% to 69.6%; and embryos obtained per spike from 0.5 to 6.3.

The original combined treatments with exogenous plant growth regulators applied *in vivo,* instead of simple treatments, increased significantly the efficiency of adapted *bulbosum* method in green house and field conditions. The treatment variants V_4 and V_5 proved to be the most useful in achieving some of the reported parameters.

Doubling chromosome number rates has been of 90.0% for cloned plants and 75.0% for non-cloned ones.

Restored fertility has been on average of 39.0 double haploid seeds per non-cloned plant and 107.8 per cloned plant.

The doubled haploid lines (DH) are in different multiplication generations (H_0, H_1 and H_2) and some of them in field trials.

The method for producing haploids and DH lines of winter barley utilized at R.I.C.I.C. Fundulea could represent a practical alternative which enables homozygosity to be achieved rapidly in spite of relative low values of haploid production efficiency (HPE) (from 0.3% in 1991 to 6.0% in 1993).

BIBLIOGRAFIE

Bjornstad A., 1986 – Partial incompatibility between Scandinavian six-rowed barley (*Hordeum vulgare*) and *Hordeum bulbosum* L. and its genetical basis. Hereditas, 104: 171–191.

Cambell K. W., Browm R. I., Ho K. M., 1984 – Rodeo barley. Can J. Plant Sci., 64. 203–205.

Chen F., Hayes P., 1989 – A comparison of *Hordeum bulbosum* – mediated haploid production efficiency in barley using *in vitro* floret and tiller culture. Theor. Appl. Genet., 77: 701–704.

Chen F., Hayes P., 1991 – Effect of exogenous plant growth regulators on *in vitro* seed growth, embryo development and haploid production in a cross between *H. vulgare* L. and *H. bulbosum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 26: 179–184.

Coles G. D., 1986 – Gwylan barley (*Hordeum vulgare* L.). New Zealand J. Exptl. Agric., 14: 101–103.

Devaux P., 1987 – Comparison of anther culture and *Hordeum bulbosum* method for the production of doubled haploid in winter barley. Plant Breed, 98: 215–219.

Devaux P., 1991 – Investigations to improves doubled haploid production efficiency in a winter barley programme. Cer. Res. Comm., 19, 1–2: 51–58.

Devaux P., Adamski T., Surma M., 1990 – Studies on low crossabilities encoutered with the *Hordeum bulbosum* method for haploid production of barley, *H. vulgare* L. Plant Breed, 104: 305–311.

Forough-Wehr B., Pickering R. A., Friedt W., 1981 – Related response of barley cultivars to the *bulbosum* and anther culture techniques of haploid production. Barley Genetics Newsletter, 11: 54–59.

Scanned with OKEN Scanner

Giura A., Mihăilescu Alexandrina, 1993 – Obținerea de haploizi prin eliminarea de genoame în hibridări interspecifice și intergenerice la orz și grâu. Lucrări științifice, XXVII, II, U.S.A.B. Timișoara: 427–430.

Giura A., Mihăilescu Alexandrina, 1994 – Homozigotarea rapidă a materialului de ameliorare la grâu și orz prin metode neconvenționale. Lucrările C.S.I.O.S. – 1994 (sub tipar).

Giura A., Mihăilescu Alexandrina, 1995 – Eficiența clonării și a dublării numărului de cromozomi pentru obținerea de linii dublu haploide (DH) homozigote la grâu și orz. Anale I.C.C.P.T. – Fundulea, LXII, 7–16.

Hayes P. M., Chen F., 1989 – Genotypic variation for *Hordeum bulbosum* L. – mediated haploid production in winter and facultative barley. Crop Sci., 29: 1184–1188.

Ho K. M., Jones G. E., 1980 – Mingo barley. Can. J. Plant Sci., 60: 279–280.

Jensen C. J., 1976 – Barley monoploids and double monoploids: techniques and experience. Proc. Int. Barley Genet. Symp., 3: 316–345.

Jensen C. J., 1977 – Monoploid production by chromosome elimination. In: J. Reinert and P. S. Bajaj (Eds.) Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture.Springer-Verlag, Berlin: 299–330.

Jensen C. J., 1983 – Producing haploid plants by chromosome elimination. In: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Proc. Workshop, Sci. Press, Beijing, China: 55–79.

Jensen C. J., 1987 – Biotechnology: barley cell and tissue culture. Barley Genetics V. Proc. of the Fifth Int. Barley, Gen. Symp. Okayama: 493–501.

Kasha K. J., Kao K. N., 1970 – High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare*). Nature, 225: 874–876.

Mihăilescu Alexandrina, 1978 – Inducerea și utilizarea haploizilor la orz. Probl. genet. teor. apl., X, 5: 533–548.

Mihăilescu Alexandrina, 1980 – Haploidia – actualitate și perspectivă. Probl. genet. teor. aplic., XIII, 1: 43–79.

Mihăilescu Alexandrina, Bude A., Giura A., 1993 – Reconsiderarea metodei *bulbosum*, alternativă de homozigotare rapidă a orzului cultivat. Probl. genet. teor. aplic., XXV, 1: 1–26.

Mihăilescu Alexandrina, Giura A., Bude A., 1994 – Increasing efficiency of barley haploid production by combined treatments with exogenous plant growth regulators applied *in vitro*. Romanian Agricultural Research, 2, 1994:25–33.

Pickering R. A., 1980 – Use of the doubled haploid technique in barley breeding at the Welsh Plant Station. In: Rep. Welsh Pl. Beed Stn, for 1979: 208–226.

Pickering R. A., 1993 a – The influence of genotype on doubled haploid barley production. Euphytica, 32: 863–876.

Pickering R. A., 1983 b – The location of a gene for incompatibility between *Hordeum vulgare* L. and *Hordeum bulbosum* L. Heredity, 51: 455–459.

Pickering R. A., Hayes J. D., 1976 – Parțial incompatibility in crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum*. Euphytica, 25: 671–678.

Pickering R. A., Renie W. F., 1990 – The evaluation of superior *Hordeum bulbosum* L. genotypes for use in a doubled haploid barley breeding programme. Euphytica, 45: 251–255.

Shugar L. P., 1989 – Comercialization of the *bulbosum* method in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Current options for cereal improvement. Doubled haploids, mutants and heterosis. Kluwer Acad. Pub.: 161–170.

Thorn E., Jensen C. J., 1985 – Haploid barley induction and the influence of embryo size and development on plant production. Hereditas Suppl., 3: 152–153.

Scanned with OKEN Scanner

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA GENOTIPULUI ASUPRA CAPACITĂȚII DE REGENERARE LA *AVENA SATIVA*

G. NEDELEA, DORICA BOTĂU, A. PERES,
AURUȚA DÂRLEA, E. MADOȘA *

Culturile *in vitro* constituie metode moderne în ameliorarea plantelor, care permit multiplicarea noilor genotipuri valoroase în timp scurt, cu eficiență maximă. Aceste tehnici oferă, de asemenea, posibilitatea studierii fenomenelor fiziologice privind creșterea, dezvoltarea și diferențierea plantelor.

Cercetările efectuate pe plan mondial privind regenerarea și multiplicarea *in vitro* la ovăz au stabilit incapacitatea unor genotipuri de a răspunde condițiilor artificiale de cultivare (Bregitzer și colab., 1991, Chizu, 1982; Sawhney și Claston, 1985).

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

În experiențele noastre au fost testate 37 soiuri de ovăz în vederea evidențierii acelora care au o bună capacitate regenerativă. Aceste soiuri vor fi utilizate în cercetările viitoare în scopul obținerii de soiuri valoroase de ovăz (tabelul 1).

Ca material biologic s-au folosit embrioni imaturi, prelevați din panicule recoltate la 14–20 zile după fecundare. După asepsie cu soluție $HgCl_2$ 0,1% și apă distilată sterilă, embrionii excizați au fost inoculați pe mediul Murashige-Skoog (MS) suplimentat cu 3 mg/l 2,4-D (acid diclorfenoxiacetic). Pentru fiecare soi s-au inoculat 50 embrioni, în trei repetiții. Incubarea inoculilor s-a făcut la temperatura de 25°C ± 2°C cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric.

* Universitatea de Științe Agricole a Banatului, Timișoara

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Genotipurile de ovăz testate în experienţele de regenerare
(The *Avena sativa* tested genotypes for regeneration)

Nr. crt. (No.)	Genotipul (Genotype)
1	Avoine de Versailles
2	Columbia
3	PA 725–2154
4	PA 725–6113
5	PA 822–818
6	Puhti
7	Bonaerouse
8	Beaver
9	Blenda
10	Bianca
11	Billidu
12	Cartier
13	Sisa Havre
14	Secter II
15	Sinelnikevski 21
16	Standard nr. 1
17	Standard nr. 2
18	Standard Extra 3
19	Târgu Frumos
20	Trekent Heimer
21	Tzia-Tzia
22	Tatarisch-Schwartz
23	Tatarisch-Sort
24	Zonne 2
25	Zonne Phaeer
26	Zenschin
27	20–60
28	90–94
29	5508
30	Dansk
31	Edelhafer
32	Koper
33	Hankijo
34	Heiki
35	Hannes
36	Macedonia
37	Yaroslavski

S-au efectuat observaţii şi pasaje pe acelaşi mediu, la interval de 21 zile. Calusul obţinut a fost utilizat pentru testarea capacităţii de regenerare pe mediu MS fără hormoni. Cercetarea fenomenului de diferenţiere s-a făcut macroscopic şi microscopic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La toate soiurile experimentate s-a constatat o proliferare a celulelor la nivelul embrionului după 40 zile de la inoculare. Originea calusului se poate localiza macroscopic la nivelul scutelumului şi mezocotilului. S-au identificat două tipuri de

calus: unul neembriogen (NE), cu o mare capacitate de diviziune, de culoare albă, foarte friabil (fig. 1) şi altul embriogen (E) cu friabilitate scăzută de culoare alb-gălbuie, care prezintă noduli mici verzi (fig. 2). Diferenţa între aceste două tipuri de calus este evidentă, putându-se face o selecţie după indicii morfologici. Toate soiurile studiate prezintă capacitate de calusare. Utilizând mediul de cultură fără hormoni s-a pus în evidenţă capacitatea de regenerare a calusului doar la unele

Fig. 1 – Calus neembriogen (Unembryogenic callus)

Fig. 2 – Calus embriogen (Embryogenic callus)

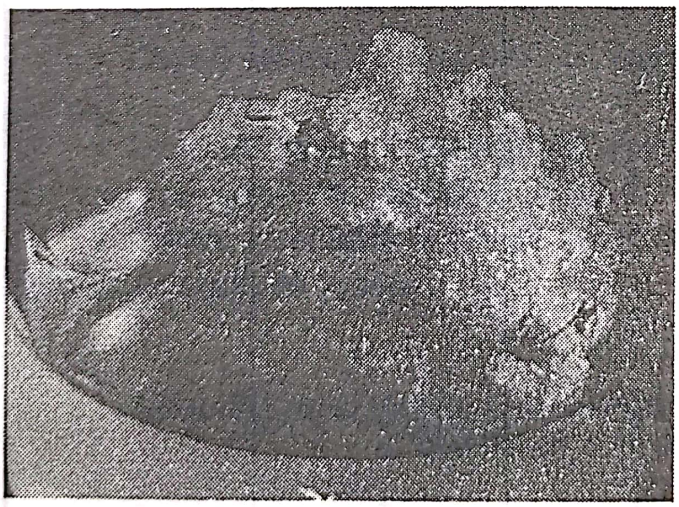


Fig. 3 – Calus cu embrioni în stadiul „torpedo" (Embryogenous callus in „torpedo" stadium)

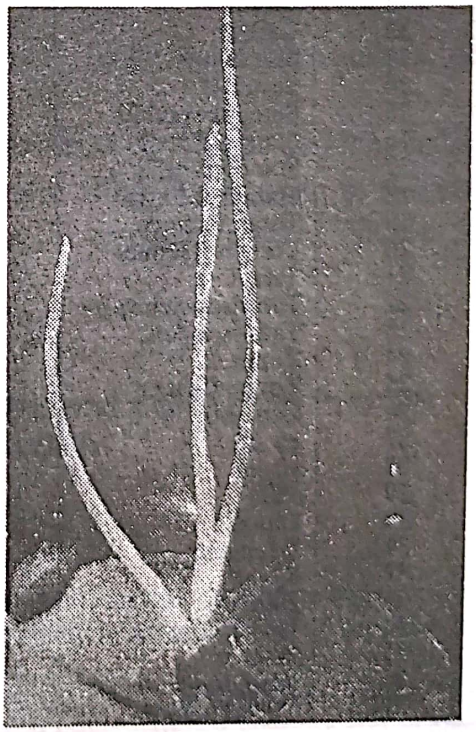


Fig. 4 – Planta regenerată de ovăz (Oat plant regenerated)

Scanned with OKEN Scanner

soiuri de ovăz. În tabelul 2 sunt prezentate rezultatele privind dediferenţierea ţesuturilor la soiurile testate.

Astfel, din aceste rezultate se observă că doar şapte genotipuri din cele 37 studiate produc calus embriogen, având capacitate regenerativă. Acestea sunt: Billidu, 20–60, Hankijo, Heiki, Hannes, Macedonia, Yaroslavski. S-a putut identifica la nivelul acestui calus formaţiuni embriogene în stadiul „torpedo" (fig. 3). Acestea se detaşează uşor de pe suprafaţa calusului, prezentând astfel caracteristica de bază a embrionilor somatici (Murray, 1993). Aceşti embrioni plasaţi pe mediu de cultură (MS) fără hormoni regenerează plante întregi (fig. 4). Nu s-au identificat plante albinotice.

Studiul microscopic al preparatelor proaspete din calus embriogen a permis identificarea unor aglomerări de celule meristematice organizate în formaţiuni ovale, alcătuind meristemoizi. În masa calusului aceştia apar ca noduli verzi.

Tabelul 2

Rezultatele privind diferenţierea la ovăz (MS + 3 mg/l 2,4-D
(Results regarding the dedifferentiation in oat)

Nr. crt. (No.)	Soiul (Cultivar)	Calus (Callus)	Calus + meristemoizi (Callus + meristemoids)	Calus + embrioni somatici (Callus + somatic embryo)
1	Avoine de Versailles	+	–	–
2	Columbia	+	–	–
3	PA 725–2154	+	–	–
4	PA 725–6113	+	–	–
5	PA 822–818	+	–	–
6	Puhti	+	–	–
7	Bonaerouse	+	–	–
8	Beaver	+	–	–
9	Blenda	+	–	–
10	Bianca	+	–	–
11	Billidu	+ + +	+ +	+
12	Cartier	+	–	–
13	Sisa Havre	+	–	–
14	Secter II	+	–	–
15	Sinelnikevski 21	+	–	–
16	Standard nr. 1	+	–	–
17	Standard nr. 2	+	–	–
18	Standard Extra	+	–	–
19	Târgu Frumos	+	–	–
20	Trekent Heimer	+	–	–
21	Tzia-Tzia	+	–	–
22	Tatarisch-Schwartz	+	–	–
23	Tatarisch-Sort	+	–	–
24	Zonne 2	+	–	–
25	Zonne Phaeer	+	–	–
26	Zenschin	+	–	–
27	20–60	+	–	–
28	90–94	+	–	–
29	5508	+	–	–
30	Dansk	+	–	–
31	Edelhafer	+	–	–
32	Koper	+	–	–
33	Hankijo	+ + +	+ +	+
34	Heiki	+ +	+	+
35	Hannes	+ +	+	+
36	Macedonia	+ +	+	+
37	Yaroslavski	+ + +	+	+

Legenda: + = calus friabil cu proliferare moderată;
+ + = calus friabil cu proliferare abundentă;
+ + + = calus granular cu proliferare abundentă.

Scanned with OKEN Scanner

Transferaţi pe mediu fără hormoni, ei regenerează plante. Cultivarea calusului embriogen în continuare, pe mediu MS cu auxină (2,4-D), a condus la pierderea capacităţii de regenerare după 60 de zile.

Tabelul 3

Influenţa genotipului asupra capacităţii de calusare şi regenerare la ovăz
(The genotype influence on callusing and regeneration capacity in oat)

Nr. crt. (No.)	Soiul (Cultivar)	% calusare (callusing)	Numărul plante regenerate (Regenerated plants)	Numărul plante înrădăcinate (Rooted plants)
1	Billidu	65	20	13
2	20 – 60	30	20	0
3	Hankijo	35	15	12
4	Heiki	36	27	10
5	Hannes	57	25	9
6	Macedonia	18	8	0
7	Yaroslavski	70	60	25

În tabelul 3 sunt prezentate rezultatele privind capacitatea de calusare şi cea de regenerare la cele şapte genotipuri de ovăz, care au răspuns cel mai bine condiţiilor artificiale de cultură.

Din datele de mai sus se constată că soiurile cu cea mai bună capacitate regenerativă sunt: Yaroslavski şi Billidu.

CONCLUZII

▼ Ovăzul prezintă capacitate de regenerare, care este dependentă de genotip.

▼ Din cele 37 soiuri studiate numai şapte manifestă capacitate de regenerare, cele mai valoroase soiuri din acest punct de vedere fiind Yaroslavski şi Billidu.

▼ Calusul embriogen îşi pierde capacitatea de regenerare după 60 zile de cultivare pe mediu cu auxină.

RESEARCHES REGARDING GENOTYPE INFLUENCE ON REGENERATION CAPACITY IN *AVENA SATIVA*

SUMMARY

There have been studied 37 oats genotypes regarding their capacity of *in vitro* regeneration. Immatur embryos from these genotypes which were cultivated en MS + 3 mg/1 2.4-D medium which 50 repetitions per genotype were used.

Research on dedifferentiation phenomenus were carried out macroscopic and microscopic. The eperimental results have been shown a large genetic variability of callus presence and their microscopic particularities. There are important differences in meristemoids presence and somatic embryos development, depending on their genotype.

Scanned with OKEN Scanner

There were identified 7 genotypes which showed a good regeneration: Billidu, 20–60, Hankijo/Heiki, Hannes, Macedonia, Yaroslavski.

They will be used in future researches.

BIBLIOGRAFIE

Bregitzer P, et al., 1991 – Callus formation and plant regeneration from somatic embryo of oat. Plant Cell Reports, 10: 243–246.

Chizu Ishii, 1982 – Callus induction and shoot differentiation of wheat, oat barley. Plant Tissue Culture.

Kaur-Sawhnwy R., Glaston A. W., 1985 – Oats Handbook of Plant Cell Culture, 2:94–106.

Murray W. Nabores, 1983 – Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. Planta, 157: 385–389.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

IDENTIFICAREA LINIILOR HOMOZIGOTE DE PORUMB DUPĂ POLIMORFISMUL GENETIC AL ZEINEI

A. ROTARI, GALINA COMAROV,
I. FRUNZE, M. OLIVERA PARI *

Succesul creării hibrizilor de porumb între linii consangvinizate cu heterozis sporit depinde de alegerea justă şi corectă a formelor parentale genetic omogene. S-a stabilit că numai prin încrucişarea liniilor homozigote se obţin hibrizi de porumb performanţi.

În practica de ameliorare şi producere a seminţelor o mare însemnătate o au metodele de identificare a liniilor homozigote de porumb, controlul purităţii lor, stabilirea originii acestor linii cu scopul de a proteja drepturile de autor ale amelioratorilor (Sidney, Williams, 1990). Pentru aceasta este nevoie de metode de identificare precise, obiective şi, pe cât este posibil, rapide. Esenţa lor constă în folosirea markerilor genetici (Smith, şi Wych, 1986).

Se ştie că drept marker genetic poate servi oricare din caracterele genetice controlabile şi de calitate, fiind folosiţi de obicei markerii morfologici. Totuşi, posibilităţile lor sunt destul de limitate. În ultimul deceniu, în multe ţări s-a intensificat folosirea efectivă a realizărilor biochimiei genetice şi a biologiei moleculare. Astfel, în etapa de încheiere a creării noilor linii, se efectuează analiza generaţiilor autopolenizate după fragmentele de restricţie ale ADN-ului (Walton, Helentjaris, 1988). Noile posibilităţi de identificare a liniilor homozigote au evidenţiat markerii proteici (Konarev, 1983).

În calitate de markeri proteici pot fi folosite numai proteinele genetic polimorfe. În această grupă, în primul rând, trebuie să fie menţionate sistemele izoenzimatice şi proteinele de rezervă (Sozinov, 1985).

În prezent, electroforeza sistemelor izoenzimatice se foloseşte destul de larg peste hotare, atât în selecţia, cât şi în producerea seminţelor la porumb pe baza studierii polimorfismului a 19 sisteme izoenzimatice ale acestei culturi (Cardy, Kannenberg, 1982; Goodman, Stuber, 1988).

* Institutul de Cercetări pentru Porumb şi Sorg Criuleni, Pașcani şi Universitatea Agrară de Stat, Chişinău, Republica Moldova

S-a studiat comparativ eficacitatea folosirii caracteristicilor morfologice şi a spectrelor izoenzimatice pentru determinarea procentului de autopolenizare a plantelor mamă de porumb în loturile de hibridare (Smith şi colab., 1986; Sarca şi Neguţ, 1988). Rezultatele pozitive ale cercetărilor efectuate sunt dovedite de faptul că în prezent în SUA şi în Franţa, electroforeza sistemelor izoenzimatice este folosită oficial pentru determinarea nivelului de tipicitate a seminţelor formelor parentale şi a hibrizilor primei generaţii (Mabbett, 1990).

Totuşi pentru identificarea completă şi stabilirea amprentei genetice a liniilor şi hibrizilor este nevoie de efectuarea analizei electroforetice pentru un mare număr de izoenzime polimorfe, deoarece în locusurile polimorfe, de obicei, se evidenţiază doar un număr foarte limitat (2–3) de forme moleculare. În acest sens, sistemele izoenzimatice cedează locul proteinelor de rezervă din bob, în majoritate polimorfe (prolaminelor de porumb – zeinei; Sozinov, 1985).

În 1965, Turner şi colaboratorii au demonstrat experimental heterogenitatea prolaminelor de porumb – a zeinei, ceea ce a permis să se elaboreze o metodă de analiză alternativă metodei controlului în câmp bazată pe heterozigozitatea zeinei, care se observă în procesul de electrofocusare a proteinelor. S-a demonstrat eficacitatea acestei metode în comparaţie cu analiza izoenzimatică şi a controlului în câmp pentru evidenţierea formelor materne autopolenizate (Motto şi colab., 1978; Leist, 1989, 1990).

Aplicarea metodei izoelectrofocusare a zeinei în practica de ameliorare şi producere a seminţelor de porumb este restrânsă din cauza necesităţii folosirii în procesul de lucru a unor reactivi foarte costisitori, cum ar fi amfoliţii.

De aceea, prezintă un mare interes elaborarea metodei de electroforeză a zeinei în soluţie-tampon acidă, metodă supersensibilă, pe baza căreia se poate evidenţia uşor şi poliformismul genetic al prolaminelor de porumb (Poperelea şi colab., 1989; Konarev şi colab., 1990). Această metodă a fost verificată şi acceptată într-o serie de centre ştiinţifice ale C.S.I. (Asâka, şi Poperelea, 1990; Comarov şi Rotari, 1990). S-a arătat avantajul metodei electroforetice a zeinei atât în comparaţie cu metoda electroforetică a izoenzimelor, cât şi în comparaţie cu metoda izoelectrofocusării: conţinutul mare al zeinei în materialul studiat (până la 60 % din proteina endospermului), uşurinţa şi simplitatea extracţiei, heterogenitatea sporită a zeinei (până la 22 componenţi electroforetici), developarea simplificată şi uşurinţa interpretării rezultatelor, condiţionate de prezenţa coloranţilor necesari (modului lor de propagare); preţul de cost per analiză scăzut şi simplitatea proceselor necesare pentru efectuarea analizelor în serie; posibilitatea păstrării după analize a unei părţi din bob care include embrionul (Comarov şi Rotari, 1990; Asâka, şi Poperelea, 1990).

În ultimii ani, pentru folosirea în serie în cercetările de ameliorare şi genetică, în procesul de producere a seminţelor a fost recomandată metoda electroforezei zeinei, care permite şi o verificare atentă, atât pe un volum mare de material ameliorat, cât şi în condiţii de producere în serie a seminţelor.

Scopul lucrării constă în studierea posibilităţilor de identificare a liniilor homozigote de porumb după poliformismul genetic al zeinei prin metoda electroforetică, sub trei aspecte: genetic, de ameliorare şi în producerea seminţelor.

Scanned with OKEN Scanner

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

În experimentări au fost folosite seminţe din hibridul de porumb Moldavskii 291 MRf din prima şi a doua generaţie, combinaţia hibridă „Liana" şi formele parentale MC 01; P 092 şi MC 03, de asemenea, colecţia de linii autopolenizate: 253 variante morfologice a 16 linii de porumb.

Electroforeza zeinei pe boabe separate de porumb a fost efectuată în gel de poliacrilamidă în soluţie-tampon acidă în prezenţa ureei, după metoda lui Poperelea şi colab. (1989) şi modificată de colaboratorii Laboratorului de biochimie, fiziologie şi biotehnologie al Institutului de Cercetări pentru Porumb şi Sorg, ASP „Porumbeni".

Descrierea spectrelor electroforetice ale zeinei au fost efectuate fie după mobilitatea relativă a benzilor electroforetice (rf), fie după aprecierea vizuală a densitogramelor.

Mobilitatea componenţilor zeinei se determină după standardul intern cu rf 60, folosind formula corespunzătoare din metoda lui Konarev şi colab. (1990):

$$rf_x = \frac{rf_{st} x L_x}{L_{st}}$$

unde:

rf_x = mobilitatea componentului pentru identificare;

L_x = distanţa de la start a componentului pentru identificare pe placa de gel obţinută;

rf_{st} = 60;

L_{st} = distanţa de start a componentului standardului intern (rf = 60) pe placa de gel obţinută.

Densitogramele spectrelor electroforetice ale zeinei au fost obţinute cu un densitometru-laser tip „Soft Lazer Scaning Densitometer" modelul SL-2D/1 DUV/VIS cu ajutorul unui program al firmei Biomed Instruments Inc. (California, SUA). Studiul omogenităţii spectrelor electroforetice ale zeinei la 253 de variante morfologice a 16 linii de porumb, s-a efectuat prin analiza a 50–100 de boabe, luate la întâmplare, din fiecare variantă.

La liniile tipice, genetic pure, toate boabele analizate au dat un singur spectru de zeină, propriu numai acestei linii.

Spectrul electroforetic al zeinei, al fiecărei variante morfologice studiate, a fost comparat cu spectrul electroforetic al zeinei liniei de origine.

Identificarea liniilor parentale printre boabele generaţiei a doua a descendenţelor hibride de porumb s-a efectuat pe baza analizei a câte 200–300 boabe luate la întâmplare, prin evidenţierea spectrului electroforetic al zeinei propriu formulei tipice a zeinei, corespunzătoare formei parentale identificate.

Aceeaşi metodă a fost folosită pentru marcarea liniei consangvinizate după spectrul componenţilor zeinei în 11 amestecuri artificiale de boabe a hibridului de

Scanned with OKEN Scanner

porumb Moldavskii 291 MRf (F_1) şi a formei lui materne MC 01 (pe baza analizei a 100–160 de boabe, luate la întâmplare).

Aprecierea purităţii genetice a partidelor de boabe din staţia de prelucrare a seminţelor, a combinaţiei hibride „Liana", s-a efectuat după procedeul cunoscut de determinare a gradului de hibriditate a porumbului prin metoda electroforetică (Poperelea şi colab., 1989).

Segregarea în F_2 la hibridul de porumb Moldavskii 291 şi a combinaţiei hibride „Liana", după modelul zeinic, s-a analizat după metoda χ^2.

A urmat analiza comparativă a rezultatelor identificării electroforetice a liniei materne MC 01 în amestecuri artificiale ale boabelor hibridului Moldavskii 291 MRf şi al formei materne, a câte 500 de boabe din fiecare amestec artificial pregătit, apoi rezultatele s-au prelucrat statistic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În studierea posibilităţii de identificare a liniilor homozigote de porumb după polimorfismul genetic al zeinei au fost efectuate experimente pentru trei aspecte: genetic, de ameliorare şi de producere a seminţelor.

Sub **aspect genetic,** a fost efectuată identificarea liniilor parentale ale porumbului, în generaţia a doua a hibrizilor, după spectrele electroforetice ale zeinei. Pentru aceasta, în experienţe au fost folosite două combinaţii hibride: Moldavskii 291 MRf şi „Liana". Studierea spectrelor electroforetice ale acestor combinaţii hibride şi ale formelor lor parentale au evidenţiat unele particularităţi distincte (tabelul 1).

În prima combinaţie a hibridului Moldavskii 291 MRf, fenotipurile proteice ale boabelor paterne şi hibride sunt identice, ambele spectre se caracterizează prin prezenţa a 12 componenţi ai zeinei. Aşadar, în a doua generaţie hibridului Moldavskii 291 MRf, prin metoda markerilor proteici se poate identifica linia maternă MC 01 după spectrul zeinei, caracterizat prin lipsa benzilor cu rf 24, 74 şi 82.

Tabelul 1

Formulele de zeină ale hibrizilor de porumb Moldavskii 291 MRf, Liana şi ale formelor lor parentale

(Zein formules of maize hybrids Moldavskii 291 MRf, Liana and their parential forms)

Genotipul (Geno-type)	rf												
MC 01	♀ x	$\overline{28}$	x	$\overline{33}$	$\overline{40}$	42	46–51	55–60	64	67	x	78	x
P 092	♂ 24	$\overline{28}$	31–33		$\overline{40}$	42	46–51	55–60	64	67	74	78	82
M 291	F_1 24	$\overline{28}$	31–33		$\overline{40}$	42	46–51	55–60	64	67	74	78	82
MC 01	♀ x	$\overline{28}$	x	$\overline{33}$	$\overline{40}$	42	46–51	55–60	64	67	x	78	x
MC 03	♂ 24	$\overline{28}$	31–33		40	$\overline{42}$	46–51	55–60	64	67–68		74	x 82
Liana	F_1 24	$\overline{28}$	31–33		40	42	46–51	55–60	64	67–68		74	78 82

Studierea componenței zeinice a combinației hibride „Liana" și a liniilor ei parentale prin metoda electroforetică a evidențiat o compoziție specifică a componenților zeinici atât pentru linia maternă MC 01 (lipsa benzilor cu rf 24, 74, 82), cât și pentru linia paternă MC 03 (lipsa benzilor cu rf 78 și schimbarea raportului de concentrare între componenții zeinici cu rf 40 și 42).

Așadar, era posibil că în a doua generație a hibridului „Liana" prin metoda markerilor proteici să fie identificată atât linia maternă MC 01, cât și linia paternă MC 03.

Analiza de segregare efectuată în F_2 la hibridul de porumb Moldavskii 291 MRf, după modelul zeinic, cu ajutorul metodei χ^2 (tabelul 2) arată că, criteriul de concordață calculat, de 0,08, nu depășește valoarea lui χ^2, de 3,84%, la nivelul probabilității de 5% (numărul corespunzător gradelor de libertate df = 1, deoarece în analiză au fost folosite două clase ale spectrelor electroforetice ale modelului proteic).

Analiza segregării în generația a doua a hibridului „Liana", prezentată în tabelul 2, a fost efectuată după trei clase ale spectrelor electroforetice ale modelului proteic (numărul gradelor de libertate df = 2). Criteriul experimental de concordanță calculat statistic de 1,92 este sigur, deoarece nu depășește valoarea din tabel a lui χ^2, care este de 5,99 la nivelul de semnificație pentru probabilitatea de 5%.

Tabelul 2

Analiza segregării în F_2 la hibridul de porumb Moldavskii 291 MRf și la combinația hibridă Liana după fenotipul zeinic prin metoda χ^2

(Segregation analysis in F_2 in maize hybrid Moldavschii 291 MRf and in hybrid combination Liana, according to zein phenotype by method χ^2)

Clasa după fenotipul zeinic (numărul de componenți) (Type according to zein phenotype, number of components)	Numărul de spectre electroforetice (Number of electrophoretic spectra)		Abatere (Deviation)		χ^2	$\chi^2_{0,05}$
	O*	E	d	d^2		
Moldavschii 291 MRf						
F_1 (12 componenți)	204	202	+2	4	0,06	
♀ (9 componenți)	65	67	–2	4	0,02	
Suma	269	269	–	–	0,08	3,84
Combinația hibridă Liana						
F_1 (12 componenți)	130	119	11	121	1,02	
♀ (9 componenți)	52	59	–7	49	0,83	
♂ (11 componenți)	55	59	–2	4	0,07	
Suma	237	237	–	–	1,92	5,99

* O = obținute „de facto"
E = presupunere teoretică (estimată)
d = O–E

$$\chi^2 = \frac{d^2}{E}$$

Trebuie subliniat că, datorită specificului morfologic al porumbului, evidenţierea unei forme parentale (în caz de dominanţă deplină) se poate efectua numai în al doilea sezon de vegetaţie, după fecundarea în combinaţie hibridă a primei generaţii (F_1).

Markerii proteici, spre deosebire de caracterele morfologice, permit să fie identificate ambele linii parentale, dacă se deosebesc după spectrul electroforetic al structurii componenţilor zeinei, după 4–5 săptămâni de la autopolenizare.

Segregarea în F_2 a combinaţiilor hibride studiate prin spectrele electroforetice ale zeinei este asigurată statistic şi corespunde segregării după schema monohibridă (1 : 3 sau 1: 2 : 1).

Sub **aspectul ameliorator,** a fost studiat polimorfismului genetic al zeinei endospermului variantelor mofologice a 16 linii de porumb autopolenizate. Majoritatea liniilor de origine studiate se folosesc intensiv în procesul de ameliorare pentru crearea hibrizilor cu heterozisul ridicat.

Spectrul electroforetic, tipic pentru fiecare variantă studiată, se compară cu spectrul electroforetic tipic al liniei de origine, ceea ce a permis evidenţierea variantei identice, după fenotipul zeinic, cu liniile originale şi variantele care se deosebesc după componenţii zeinei spectrului electroforetic al liniei iniţiale.

După cum arată datele tabelului 3, în urma studierii spectrului electroforetic al zeinei la 253 de variante morfologice a 16 linii autopolenizate, s-au evidenţiat 97, care se deosebesc după componenţa electroforetică a zeinei de la liniile de origine.

Tabelul 3

Rezultatele studierii electroforetice a zeinei endospermului variantelor morfologice ale liniilor autopolenizate de porumb

(Results regarding the electrophoretic analysis of endosperm zein in morphological variants of self-pollination maize lines)

Nr. crt. (No.)	Denumirea liniei (Line)	Numărul de variante morfologice (Number of morphological variants)		Modelele (Models), %
		total (total)	care se deosebesc după spectrul electroforetic al zeinei (which are differentiated depending on electrophoretic spectrum of zein)	
1	MC 01	99	32	32,3
2	MC 390	19	5	26,3
3	MC 04	6	0	0,0
4	P 343	7	2	28,6
5	P 092	15	6	40,0
6	Co–72–75–6	13	3	23,1
7	Mo 17	20	7	35,0
8	A 619	15	13	86,7
9	Z 10	6	0	0,0
10	Ma 21	3	1	33,3
11	Co 255	3	1	33,3
12	F 2	24	16	66,7
13	OS 44	8	3	37,7
14	F 7	2	0	0,0
15	Co 125	7	6	87,5
16	BC 252	7	2	28,6
	Total	253	97	38,3

Scanned with OKEN Scanner

Cea mai mare cantitate de modele electroforetice evidenţiate este caracteristică pentru grupa liniei F_2 (66,7%); Co 125 (85,7%) şi A 619 (86,7%). Variantele selectate prezintă un interes deosebit pentru lărgirea diversităţii genetice a materialului iniţial de ameliorare a porumbului.

În ceea ce priveşte **producerea de seminţe,** a fost efectuată identificarea formei materne în 11 amestecuri artificiale de seminţe hibride F_1 ale hibridului de porumb Moldavskii 291 MRf, cu un nivel variabil de impurificare cu seminţele formei materne.

După cum arată rezultatele tabelului 4, procentul spectrelor electroforetice ale zeinei liniei materne MC 01 în amestecurile de seminţe studiate variază de la 1 până la 23%, atunci când teoretic procentul aşteptat variază de la 0 până la 20%.

Trebuie remarcat că seminţele hibridului Modavskii 291 MRf, folosite pentru pregătirea amestecurilor artificiale, n-a fost în prealabil apreciate în laboratorul de producere a seminţelor pentru gradul de hibriditate şi, în acest fel, hibriditatea de 100% a amestecului artificial N 1 a fost admisă formal. Şi totuşi, aprecierea valorii de diferenţiere între mediile celei mai mici diferenţe existente (DL) a arătat că, la nivelul de asigurare pentru probabilitatea de 5%, diferenţa de fapt (d) nu este semnificativă, ceea ce dă posibilitatea să fie apreciată pozitiv valoarea folosirii metodei electroforetice a zeinei pentru identificarea formelor materne sau altor seminţe în hibrizii şi respectiv, în liniile consangvinizate de porumb.

Tabelul 4

Identificarea formei materne de porumb în amestecuri artificiale de seminţe ale hibridului Moldavskii 291 MRf şi ale liniei MC 01

(Identification of the maize maternal forms in artificial seed mixture of Moldavskii 291 MRf hybrid and MC 01 line)

Numărul curent al amestecului artificial (Number of artificial mixture)	Numărul de spectre (Number of spectra)			% de hibridare (% of hybridization)	
	♀	F_1	total	experiment electroforetic (EF) (electro-phoretic experiment)	presupunere teoretică (estimată) (theoretical supposition)
1	1	161	162	99	10
2	3	159	162	98	98
3	6	100	106	94	96
4	9	99	108	92	94
5	12	96	108	90	92
6	13	94	107	88	90
7	18	88	106	84	88
8	19	88	107	82	86
9	21	82	103	80	84
10	22	82	104	79	82
11	24	79	103	77	80
Diferenţa 5% limită	–	–	–	–2,45 6,39	

În scopuri practice, această metodă a fost folosită pentru aprecierea expresă a purităţii genetice a amestecurilor naturale în partidele de seminţe din staţia de condiţionare a seminţelor pentru combinaţia hibridă „Liana" (tabelul 5).

Tabelul 5

Aprecierea purităţii genetice a partidelor de seminţe din hibridul Liana provenite de la uscătorul din Căuşeni cu ajutorul metodei electroforetice a zeinei

(Evaluation of genetic purity in hybrid seeds Liana from Căuşeni factory by electrophoretic analysis of zein)

Numărul partidei (No.)	Numărul de spectre electroforetice (Number of electrophoretic spectra)				% de hibridare (% of hybridization)
	linia maternă (maternal line)	impurităţi (impurities)	F_1	total	
1	3	0	97	100	97
2	6	1	93	100	93

După cum arată rezultatele din tabelul 5 la două partide de seminţe ale hibridului „Liana", obţinute de la staţia de condiţionare a seminţelor de porumb din Căuşeni, numărul de spectre al liniei materne MC 01 identificate varia de la 3 la 6%, şi cu 1% impurităţi de alt soi în partida a doua.

Astfel, rezultatele obţinute confirmă eficacitatea modului de apreciere a purităţii hibrizilor prin identificarea formelor materne cu ajutorul metodei electroforetice a zeinei în generaţia F_1 a hibrizilor de porumb.

CONCLUZII

Prin metoda electroforetică a zeinei pot fi identificate formele homozigote de porumb, ceea ce permite:

- Micşorarea duratei analizei hibridologice;
- Diferenţierea genetică între variantele morfologice şi materialul iniţial supus ameliorării;
- Aprecierea autenticităţii purităţii genetice a hibrizilor F_1, în anul de recoltare.

THE IDENTIFICATION OF MAIZE HOMOZIGOTE LINES BY GENETIC POLIMORPHISM OF ZEIN

SUMMARY

This paper briefly outlines the possibility of a method for the identification of maize lines by poliacrylamide gel electrophoresis of the seed storage proteins (zein) in three aspects: genetic, selection and seed production-

It has been shown in the present study, that electrophoretic method of zein, permits:

- to reduce the time of hybridological analysis;
- at the protein level – to put in evidence the genetic variability of morphological versions of maize output selection material;
- to estimate the hybrid combination genetic purity in the period of harvesting.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Asâka I. A., Poperelea F. A., 1990 – Kontrol geneticeskoi cistotâ seman kukuruzâ metodom electroforesticeskogo analiza zeina (rekomendaţii). Moskva: 38.

Cardy B. J., Kannenberg L. W., 1982 – Allozimic variability among maize inbred lines and hybrids: applications for cultivar identification. Crop Sci., 22, 5: 1016–1020.

Comarova G., Rotari A., Rudenko V., 1990 – Ispolzovanie metoda electroforeza zeina v selekţii i semenovodstve kukuruzî v Moldove. Informaţionnâi biuleten po kukuruze. VNR, Martonvaşar, 8: 415–422.

Goodman M. M, Sturber Ch, W., Newton K., – Weissinger H., 1988 – Linkage relationships of 19 enzime loci in maize. Genetics, 96: 697–718.

Konarev V. Gh., Sidorova V. V., Timofeeva T. I., 1990 – Electroforez zeina kak metod identifikaţii, registraţii i analiza sortov, linii i ghibridov kukuruzî. Selskohozeaistvennaia biologia, 3: 167–177.

Leist N., 1989 – Nachweis des selbtungsanteils bei Hybridsaatmais mittels Elektrophorese. Mais, 17, 1: 30–35.

Leist N., 1990 – Quality control with electrophoresis in hybrid maize. Proc. of the 4th Int. Symp., on: Development and Application of New Technologies for Varietal Identification. Iowa, USA.

Mabbett T. U., 1992 – Chemical hybridising agent cuts coats. Prophyta, 2/X: 30–31.

Motto M., Salamini F., Reggitani R., Soave C., 1978 – Evaluation of genetic purity in hybrid corn (*Zea mays* L.) seed production through zein izoelecphoretic patterns. Maidica, 24: 223–229.

Poperelea F. A., Asâka I. A., Kluciko P. F., Sokolov V. M., Trofimov V. A., 1989 – Opredelenie hibridnosti semian kukuruzî po electroforeticeskim spektram zeina. Doklado Vashnil, 3: 2–4.

Sidney B., Williams Jr., 1990 – The role of intelectual property protection in commercial breeding. Iowa, SUA.

Smith J. S., Wych R. D., 1986 – The identification of female selfs in hybrid maize: a comparision using electroforesis and morphology. Seed Sci. Technology., 14: 1–8.

Sozinov A. A., 1985 – Polimorfizm belkov i ispolozovanie ih v genetike i selekţii rastenii. Moskva, Nauka.

Sarca Vasilichia, Neguţ Elena-Lucica, 1988 – Identificarea plantelor netipice din sămânţa de porumb prin postcontrol şi electroforeză. Probl. genet. teor. aplic., XX, 1: 29–42.

Turner J. S., Baudy J. A., Dimler R. J., 1965 – Zein, a heterogenous protein containing disulfide linked agregates. Seral Chem, 42: 452–455.

Walton M., Helentjaris T., 1988 – Application of restriction fragment length polymorphism (REZP) technology to maize breeding. 42 nd Annual Corn and Sorghum Research Conference: 48–75.

Scanned with OKEN Scanner

INDUCEREA PLANTULELOR PRIN ANDROGENEZĂ LA PORUMB

NINA FRUNZE *

O problemă prioritară în ameliorarea tuturor culturilor o constituie crearea şi diversificarea materialului iniţial. Pentru cultura porumbului, crearea liniilor consangvinizate prin metode convenţionale este un proces destul de dificil şi îndelungat. Ca urmare, se simte necesitatea introducerii şi pentru ameliorarea porumbului, a unor metode neconvenţionale, mai rapide, mai eficiente şi mai uşor de manevrat (Genovesi şi Collins, 1982).

Aşa cum este cunoscut din literatura de specialitate, obţinerea haploizilor de porumb depinde de o serie de factori ca: genotipul (Hu Han şi colab., 1978), faza microsporilor cultivaţi pe mediul de cultură (Miao şi colab., 1978), pretratamentul aplicat anterelor înainte de incubarea lor pe mediu pentru a se obţine calus şi embrioizi, compoziţia mediului etc. (Ku şi colab., 1978).

Lucrarea prezentă abordează probleme legate de testarea şi identificarea genotipurilor cu un potenţial înalt de androgeneză şi a celor capabile să formeze embrioizi şi neoplantule viabile, precum şi influenţa componentelor mediului de cultură asupra capacităţii de calusare şi „germinare" a anterelor.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

În scopul depistării genotipurilor de porumb, care au un înalt nivel de androgeneză, s-a luat în studiu un număr de 85 genotipuri, dintre care 41 hibrizi F_1, 22 linii consangvinizate şi 22 populaţii autohtone de la care s-au recoltat paniculele, s-au efectuat analize microscopice prin colorare cu aceto-carmin pentru a stabili faza microsporilor.

Paniculelele au fost supuse unui tratament termic (temperatura 8° C, care a durat 14 zile).

* Institutul de Cercetări pentru Porumb şi Sorg, Criuleni, Republica Moldova

Scanned with OKEN Scanner

Ulterior, anterele cu microspori aflaţi în stadiul uninucleat (mid-mijlocie) (Murashige-Skoog, 1962) au fost incubate pe diferite variante de mediu nutritiv.

S-a lucrat cu mediile de cultură Yu-Pei (Ku şi colab., 1978), Zheng 14 (Petolino şi Jones, 1968 b), Murashige-Skoog şi N 6 (Ting şi colab., 1981), atât în stare lichidă, cât şi solidificate cu agar şi s-au testat 86 variante fitohormonale (2,4 D, kinetină, BAP, ANA, AIA ŞI 2-4-5 triiodbenzoic acid-Tiba). Ca adaosuri organice la mediile nutritive, s-au folosit peptona de cazeină, glutamina, L-asparagina, extracte din cartof şi din drojdii.

Recipientele cu antere pasate pe mediile de cultură au fost trecute la întuneric, la temperatura de 27° C şi menţinute în aceste condiţii timp de 30 zile, după care s-au efectuat observaţii asupra capacităţii de calusare şi germinare a anterelor. Ulterior, produşii androgenetici au fost cultivaţi pe medii diferenţiate, iar culturile au fost transferate în condiţii fotoperiodice (alternanţa lumină-întuneric) şi temperatură de 25° C.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În majoritatea surselor documentare consultate evidenţiază fenomenul calogenezei şi formarea embrioizilor la porumb, numai la genotipuri de proveniență chineză ca: Ching Huang 9; 13; 204 şi altele. Deoarece nu am dispus de aceste genotipuri, ne-am propus depistarea surselor capabile de calogeneză prin androgeneză, printre hibrizii simpli, soiurile autohtone şi liniile consangvinizate din colecţia institutului. Din numărul total de 85 surse studiate, s-au obţinut calus şi embrioizi numai la 14 si anume: 9 hibrizi simpli F_1; 2 linii consangvinizate şi 3 populaţii locale (tabelul 1).

Analiza datelor experimentale referitoare la interacţiunea mediului de cultură şi a genotipului asupra potenţialului de inducţie şi regenerare a calusului şi embrioizilor împarte aceste genotipuri în două categorii:

1. cu potenţial de inducţie şi regenerare mare (genotipul 1 şi 2);
2. cu potenţial de inducţie şi regenerare mai redus (genotipurile 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

Genotipul 1 formează calus şi embrioizi pe toate mediile analizate (MS, N 6, Yu-Pei şi Zheng 14), dar cu frecvenţe diferite. Cel mai înalt procent de inducţie (9,38) a fost observat pe mediul de cultură Yu-Pei (3), la genotipurile 1 şi 2 (tabelul 1). Pe mediul de bază N 6, procentul de inducţie a fost mai redus (4,08).

O analiză comparativă a rezultatelor conduce la concluzia că deşi pe mediul de bază Zu-Pei s-a observat cel mai înalt procent de inducţie, au răspuns prin calusare şi formare de embrioizi numai patru genotipuri în comparaţie cu varianta cu mediul de bază N 6 – la care au reacţionat 8 genotipuri, dar cu procentaj mai redus (per genotip). Ca urmare, considerăm că mediul N 6 s-a dovedit mai adecvat pentru obţinerea de neoplantule prin androgeneză.

Mai puţin inductibil s-a dovedit mediul MS.

În multe cazuri, genotipul cu numărul 10 a format embrioizii fără a fi parcurs culturile de pasaj (nu a fost transferat pe medii de diferenţiere), obţinându-se astfel o embriogeneză directă fără trecere prin faza de calus.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Influența genotipului și a mediului de cultură asupra frecvenței de inducție a calusului și embrioizilor
(Effect of genotype and medium on the induction frequency of callus or embryoids)

Genotipul (Genotype)	MS			Mediul (Medium)								
				N 6			Yu-Pei			Zheng 14		
	antere cultivate nr. (cultivated anthers), nr.	inducția de calus și embrioizi (induction of callus and of embrioyds)		antere cultivate nr. (cultivated anthers), nr.	inducția de calus și embrioizi (induction of callus and of embrioyds)		antere cultivate nr. (cultivated anthers), nr.	inducția de calus și embrioizi (induction of callus and of embrioyds)		antere cultivate nr. (cultivated anthers), nr.	inducția de calus și embrioizi (induction of callus and of embrioyds)	
		nr.	%		nr.	%		nr.	%		nr.	%
1	240	3	1,25	245	10	4,08	160	15	9,38	870	3	0,34
2	–	–	–	400	2	0,50	160	15	9,38	120	4	3,33
3	90	1	1,11	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	240	1	0,24	–	–	–	90	1	1,11	–	–	–
5	120	1	0,83	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	80	1	1,25
7	–	–	–	90	1	1,11	–	–	–	–	–	–
8	120	1	0,83	180	6	3,33	180	2	1,11	–	–	–
9	–	–	–	120	1	0,83	–	–	–	–	–	–
10	–	–	–	480	2	0.42	–	–	–	–	–	–
11	–	–	–	80	1	1,25	–	–	–	–	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	120	2	1,67
13		–	–	–	–	–	–	–	–	40	1	2,50
14		–	–	60	2	3,33	–	–	–	–	–	–

Scanned with OKEN Scanner

O bună parte din genotipuri au format numai calus care necesită cultivarea acestora pe medii de diferențiere (în prezența hormonilor) pentru a regenera în plantule. Acest mecanism a fost studiat în detaliu de Kuo-Cheng-Shen (5). Preponderent, plantulele au derivat din antere conținând grăunciori de polen în stadiul uninucleat mijlociu.

CONCLUZII

▼ Din 85 surse testate *in vitro* prin cultura anterelor, numai 14 au răspuns androgenetic.

▼ Ca rezultat al experimentării a 86 variante de mediu nutritiv, s-au evidențiat mediile cu baza Yu-Pei, N 6 și Zheng 14.

▼ Randamentul răspunsului androgenetic la genotipurile testate au avut valori cuprinse între 0,24–9,38%.

▼ Dintre genotipurile luate în studiu, în ce privește rata anterelor cu răspuns androgenetic a fost indentificat numai genotipul 1 (9302), care utilizat în încrucișări cu alte forme de porumb, mărește semnificativ transmiterea ereditară a frecvenței gameților funcționali capabili de a induce calus și embrioizi la anterele hibrizilor F_1.

INDUCTION OF POLLEN PLANTLETS (*ZEA MAYS* L.)

SUMMARY

Anthers from 85 genotypes were cultured to optimize the pretreatment and culture conditions. In our experiment there were used anthers at the mid-unicellular stage. Only 14 genotypes have been found to be responsive to anther culture. The ratio of the embryoids and callus varied in a large measure depending on the material and the medium which have been used.

Pollen plants in maize could arise by direct development of microspore intro embryoides and subsequently into plantlets.

BIBLIOGRAFIE

Genovesi A. D., Collins G. B., 1982 – *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. Corp Sci., 22: 1137–1144.

Hu Han e.a., 1978 – Aplication of anther culture to crop plants. Acta Genetica Sinica, 12: 138–142.

Ku M. K. e. a., 1978 – Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen-derived plants of maize (*Zea mays* L.). Proc. Symp Plant Tissue Cult.: 35–42

Miao S. H. e.a., 1978 – Induction of pollen-plants of maize and observations on their progeny. Proc. Symp. Plant Tissue Cult.: 23–33.

Murashige T., Skoog F., 1962 – Physiology Plant, 15: p. 473.

Petolino S. F., Jonnes A. M., 1968 b – Anther culture of elite genotypes of maize. Crop Sci., 26: 1072–1074.

Research Group N 104, Genetics Institute Academia Sinca, Beijing, China, Acta Genet. Sinica, 2 (1975): p. 138.

Ting Y. C. e. a., 1981 – Improved anther culture of maize (*Zea mays* L.) Plant Sci Lett., 23: 139–145.

Scanned with OKEN Scanner

CERCETĂRI ELECTROFORETICE ALE PROTEINELOR ZEINICE ÎN PROCESUL VARIABILITĂȚII SOMACLONALE LA PORUMB

GALINA COMAROV, I. ANȚIBOR, A. ROTARI, N. CLIMENCO *

Variabilitatea somaclonală este un fenomen destul de răspândit al schimbărilor genetice, care se observă în procesul de obţinere a plantelor regenerate *in vitro* (Larkin, 1981).

În prezent, una din direcţiile de perspectivă în ameliorare este folosirea diversităţii de forme, care se creează în procesul de cultivare a celulelor şi ţesuturilor de plante pe mediile de cultură artificiale. Unele variaţii somaclonale evidenţiază anumite însuşiri folositoare, de interes pentru ameliorator: productivitatea mare, rezistenţa la boli şi secetă, la salinitate etc. (Vasil, 1987).

Variabilitatea somaclonală la porumb se bucură de multă atenţie (Novak şi colab., 1988; Nešticky, 1989).

Datele obţinute de Lazanyi (1988) evidenţiază o considerabilă variabilitate somaclonală în funcţie de înălţimea plantelor şi data înfloririi acestora, în R_2 şi R_3, obţinute prin autoploenizarea regeneranţilor din calusul embrionilor imaturi a liniei de porumb Chi-31.

Gobel şi colaboratorii (1986) au analizat variabilitatea somaclonală la plantele regenerate ale liniei consangvinizate A 188 şi ale descendenţelor (obţinute prin organogeneză indirectă) după caracterele morfologice şi fiziologice. Toate plantele regenerate se deosebeau de cele martor prin înălţimea redusă şi productivitatea mai mică.

În R_2, la majoritatea descendenţelor au fost evidenţiate schimbări nu numai morfologice şi fiziologice, ci şi la nivel molecular.

ADN-ul separat din plantele regenerate R_2 se deosebea după gradul de metilare de ADN-UL plantelor de origine.

Pentru aprecierea variabilităţii somaclonale la porumb se foloseşte indicatorul longevităţii de cultivare a calusului.

* Universitatea Agrară de Stat, Chişinău; Institutul de Cercetări Ştiinţifice pentru Porumb şi Sorg, Criuleni, Pașcani, Republica Moldova

Scanned with OKEN Scanner

Armstrong şi Philips (1988) au remarcat că odată cu majorarea longevităţii de cultivare a calusului la porumb (de la 16 până la 36 de săptămâni), frecvenţa variabilităţii creşte brusc.

Aprecierea tradiţională a somaclonelor de porumb după parametrii morfologici şi fiziologici nu poate să asigure în totalitate selectarea variantelor somaclonale veritabile.

Pornind de la realizările noi ale geneticii biochimice şi moleculare, aprecierea variabilităţii genetice a tipicităţii formelor genetice se poate realiza mai eficient cu ajutorul markerilor proteici.

Datele din literatura privitoare la eficacitatea folosirii spectrelor izoenzimatice ca markeri biochimici ai embriogenezei (Misarin şi colab., 1977; Franz, 1989; Evereft şi colab., 1985), alături de observaţiile efectuate asupra stadiilor de cultură aseptică a ţesuturilor (Racchi şi Mo Rongda, 1991), indică valoarea markerilor proteici pentru aprecierea variabilităţii somaclonale la porumb.

Spre deosebire de metoda electroforezei izoenzimelor, metoda electroforetică a proteinei de rezervă din porumb (zeina) are câteva avantaje: localizarea mai uşor a zeinei în endosperm, ceea ce dă posibilitate păstrării viabilităţii seminţelor după analiză, heterogenitatea considerabilă a zeinei (până la 22 componenţi codificaţi de 22 gene, spre deosebire de 2–3 gene implicate în biosinteza unei enzime (Asâka şi colab., 1993).

Scopul lucrării de faţă îl constituie posibilitatea folosirii metodei electroforetice a proteinei de rezervă din porumb (zeina), pentru aprecierea variabilităţii somaclonale.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Pentru studierea variabilităţii somaclonale au fost folosite descendenţele de porumb R_2 obţinute din culturile de calus ale embrionilor imaturi aparţinând liniilor de porumb Poly 17, MC 01 şi BC 27 D4 – 17 variante somaclonale, din ele: 7 variante somaclonale ale liniei Poly 17; 5 – ale liniei MC 01 şi 5 – ale liniei BC 27 D4.

Aprecierea morfologică a variabilităţilor somaclonale s-a efectuat după terminarea procesului de modelare în funcţie de următorii parametri biometrici: înălţimea plantei, înălţimea de inserţie a ştiuletului inferior, lungimea paniculului, numărul rămurelelor în panicul şi numărul frunzelor pe plantă. Măsurătorile s-au făcut pe câte 10 plante din fiecare variantă somaclonală şi din linia iniţială. Datele au fost prelucrate statistic.

Electroforeza zeinei din boabele de porumb individuale s-a efectuat în soluţie de tampon acid în gel de poliacrilamidă în prezenţa ureei, după metoda lui Poperelea şi colaboratorii (1989), în modificarea elaborată în laboratorul de biochimie, fiziologie şi biotehnologie a Institutului de Cercetări Ştiinţifice pentru Porumb şi Sorg A.S.P. Porumbeni.

Interpretarea spectrului electroforetic al zeinei s-a realizat după formula lui Konarev şi colaboratorii (1990), care permite să fie calculată mobilitatea electroforetică relativă a fiecărui component electroforetic identificat:

Scanned with OKEN Scanner

$$rf_x = \frac{rf_{st} \times L_x}{L_{st}}$$

unde:

rf_{st} = 60;

L_{st} = distanța componentului standardului intern (rf 60) pe placă (de la start);

L_x = distanța componentului, care trebuie să fie identificat;

rf_x = mobilitatea componentului identificat.

Pentru aprecierea omogenității genetice a liniilor originale și variantelor somaclonale s-a efectuat și analiza electroforetică din extractul de amestec de boabe (50–100) (Konarev și colab., 1990).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru fiecare din cele trei grupe ale variantelor somaclonale aparținând liniilor Poly 17, MC 01 și BC 27-D4 s-a efectuat comparativ studierea poliformismului genetic al zeinei din somaclonele corespunzătoare prin metoda electroforetică și aprecierea morfologică în condiții de câmp, pentru fiecare grupă de somaclone.

Grupa somaclonelor liniei Poly 17

Electroforegramele prezente în figura 1 evidențiază faptul că nici una din variantele somaclonale nu corespunde fenotipului proteic al liniei inițiale Poly 17. Pentru variantele somaclonale 76 și 79 sunt caracteristice schimbări simultane atât în compoziția componenților zeinei în regiunea celor cu migrare lentă (rf 0,3–0,4), cât și a celor cu migrare rapidă (rf 0,6–0,77); pentru variantele 75 și 82 – în regiunea componenților cu migrare mijlocie (rf 0,45–0,47) și cu migrare rapidă (rf 0,7–0,77), dar pentru variantele 78, 80, 81 – numai în regiunea componenților zeinei cu migrare rapidă (rf. 0,7–0,77). Dintre ele, varianta 81 după fenotipul ei proteic, este mai apropiată de linia originală.

Cea mai vulnerabilă țintă biochimică pentru variantele somaclonale ale liniei Poly 17 este regiunea componenților electroforetici ai zeinei, care migrează rapid.

De asemenea, trebuie menționat că numai variantele somaclonale 75 și 82 au fost tipice după fenotipul proteic cu 100%. La toate celelalte variante au fost evidențiate modificări după spectrul electroforetic al zeinei: tipicitatea lor a variat de la 60 până la 80%.

Aprecierea morfologică ulterioară a variantelor somaclonale studiate la linia Poly 17 a permis calcularea coeficientului de variabilitate pentru fiecare parametru al măsurătorilor biometrice.

Analizând datele din tabelul 1 pentru linia inițială Poly 17 nivelată fenotipic, coeficientul de variabilitate al caracterelor studiate are o semnificație slabă și medie. Prin analogie, aceeași imagine se urmărește și pentru variantele somaclonale 75 și 82, ceea ce confirmă constatarea vizuală de nivelare a acestora.

Scanned with OKEN Scanner

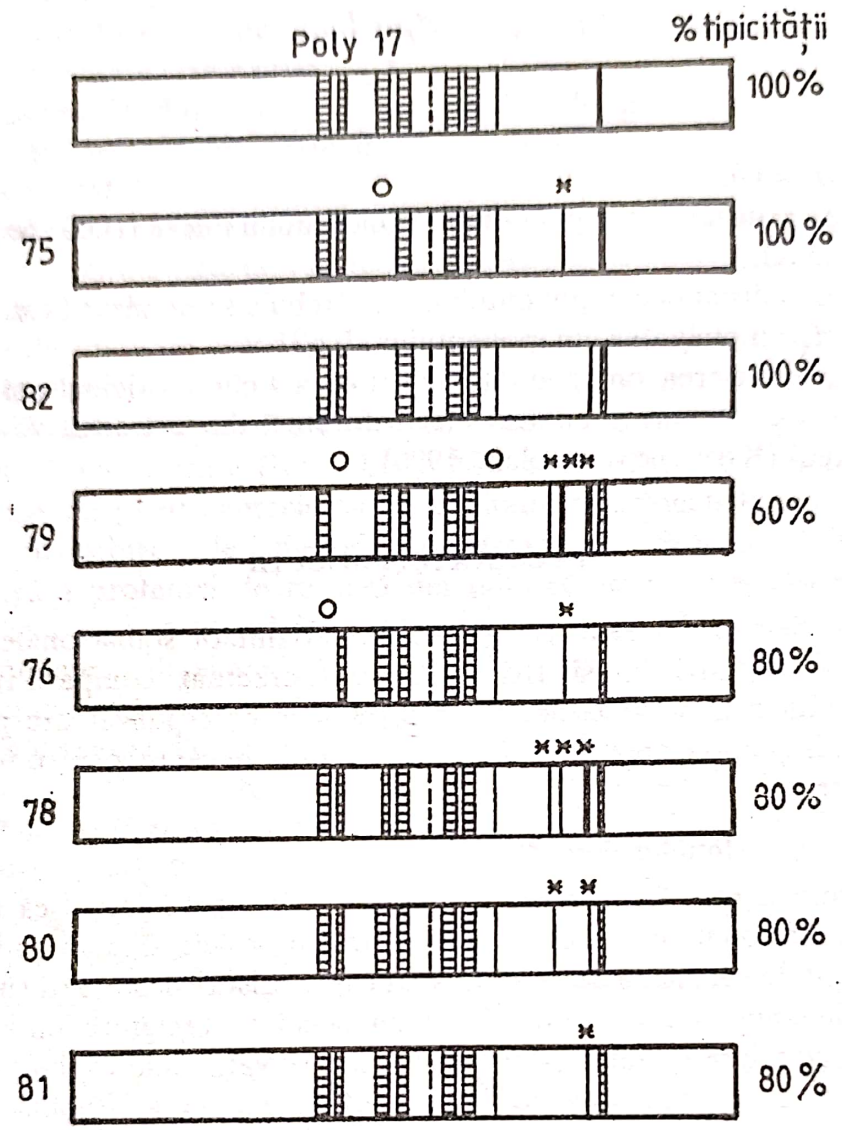


Fig. 1 – Spectrele electroforetice ale zeinei la variantele somaclonale ale liniei Poly 17 (Electrophoretic spectrum of zein in somaclonal variants of line Poly 17)

Pentru variantele somaclonale 76 şi 79 coeficientul de variabilitate pentru înălţimea de inserţie a primului ştiulete are o însemnătate considerabilă.

Pentru variantele somaclonale 80 şi 81, se intensifică variaţia pentru: numărul rămurelelor de panicul, iar pentru varianta somaclonală 78 au fost evidenţiaţi doi coeficienţi de variabilitate de o importanţă considerabilă, atât după înălţimea de inserţie a ştiuletului, cât şi după numărul rămurelelor pe panicul.

Comparând datele aprecierii electroforetice şi morfologice (tabelul 1) a variantelor somaclonale permite evidenţierea următoarelor relaţii:

1 – tipicitatea de 100% stabilită după spectrele zeinei a variantelor somaclonale 75 şi 82 este confirmată de nivelarea după caracterele morfobiologice;

2 – îmbinarea schimbărilor în structura componenţilor zeinei în zonele de migrare lentă şi rapidă la variantele somaclonale 76 şi 79 corelează cu intensificarea variabilităţii fenotipice – înălţimea de inserţie a ştiuletului;

Tabelul 1

Coeficientul de variabilitate (%) a caracterelor morfobiologice la variantele somaclonale ale liniei Poly 17
(Coefficient of variability (%) of morphobiological characters analyzed at somaclonal variants of Poly 17 line)

Numărul variantelor somaclonale (Number of somaclonal variants)	Înălţimea plantei (Height of plant), cm	Înălţimea de inserţie a ştiuletului (Height of cob), cm	Lungimea paniculului (Length of panicle), cm	Numărul ramificaţii panicul (Number of ramifications/panicle)	Numărul de frunze (Number of leaves)
Linia iniţială	4	19	6	18	7
75	8	15	9	15	13
82	4	20	9	17	7
76	6	21	7	6	12
79	5	24	9	16	11
78	5	26	11	29	6
80	6	20	12	34	6
81	5	19	8	21	16

3. – coeficientul de variabilitate a valorii mari după numărul de rămurele pe panicul caracterizează acele variante somaclonale (78, 80, şi 81) la care fenotipul proteic se schimbă esenţial în regiunea componenţilor zeinei, care migrează rapid.

Spre deosebire de aprecierea morfologică a analizei electroforetice după boabe a fiecărei variante somaclonale, se poate realiza, şi în acelaşi timp şi estima, atât variabiiitatea, cât şi tipicitatea variantelor somaclonale studiate după markerii proteici.

Grupa variantelor somaclonale ale liniei MC 01

Aprecierea morfobiologică a variantelor somaclonale după înălţimea de inserţie a ştiuletului şi numărul rămurelelor per panicul arată o variabilitate convingătoare la majoritatea formelor studiate, ceea ce permite evidenţierea deosebirilor genotipice între variantele somaclonale studiate (tabelul 2).

Tabelul 2

Coeficientul de variabilitate (%) a caracterelor morfobiologice la variantele somaclonale ale liniei MC 01
(Coefficient of variability (%) of morphobiological characters analyzed at somaclonal variants of MC 01 line)

Numărul variantelor somaclonale (Number of somaclonal variants)	Înălţimea plantei (Height of plant), cm	Înălţimea de inserţie a ştiuletului (Height of cob), cm	Lungimea paniculului (Length of panicle) cm	Numărul ramificaţii/panicul (Number of ramifications/panicle)	Numărul de frunze (Number of leaves)
Linia iniţială	6	30	4	28	7
84	8	24	35	32	12
85	4	15	13	39	8
86	6	21	8	48	12
87	5	15	16	32	14
88	4	11	6	25	9

Scanned with OKEN Scanner

Electroforegramele prezentate în figura 2 realizează următoarele aspecte:

1 – toate variantele somaclonale ale liniei MC 01, după fenotipul proteic, se deosebesc esenţial de forma iniţială în regiunea componenţilor zeinei, care migrează lent sau rapid;

2 – fenotipul proteic este specific fiecărei variante somaclonale studiată;

3 – tipicitatea variantelor somaclonale după spectrele zeinei variază de la 50 până la 100%.

Doar o singură variantă somaclonală, N 88, a fost nivelată – aspect demonstrat prin datele atât electroforetice, cât şi morfobiologice.

Grupa variantelor somaclonale ale liniei BC 27-D4

Experimental a fost relevată aceeaşi superioritate în aprecierea electroforetică a variantelor somaclonale (tabelul 3).

După cum arată datele tabelului 3 la variantele acestei linii s-a urmărit variabilitatea în funcţie de: înălţimea de inserţie a ştiuletului, numărul ramificaţiilor paniculului, înălţimea plantei şi lungimea paniculului. Pentru varianta somaclonală

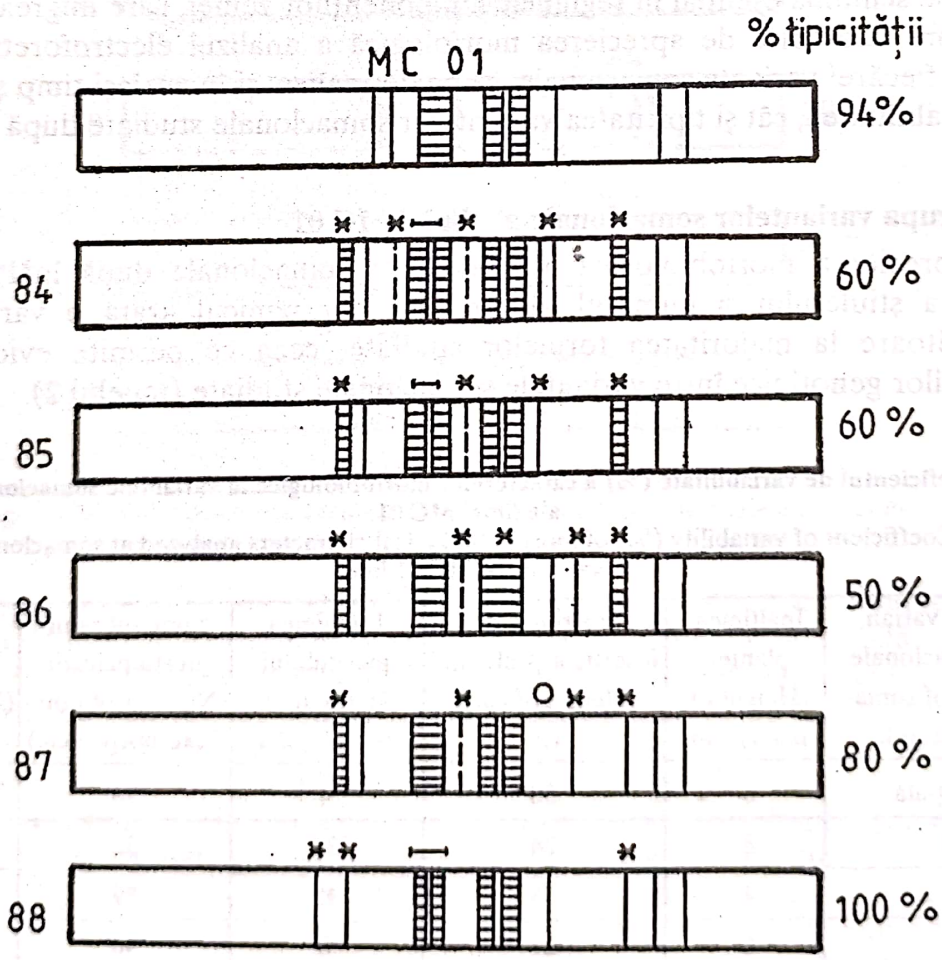


Fig. 2 – Spectrele electroforetice ale zeinei la variantele somaclonale ale liniei MC 01 (Electrophoretic spectrum of zein in somaclonal variants of line MC 01)

Tabelul 3

Coeficientul de variabilitate (%) a caracterelor morfobiologice la variantele somaclonale ale liniei BC 27-D4
(Coefficient of variability (%) of morphobiological characters analysed at somaclonal variants of BC 27-D4 line)

Numărul variantelor somaclonale (Number of somaclonal variants)	Înălțimea plantei (Height of plant), cm	Înălțimea de inserție a știuletului (Height of cob), cm	Lungimea paniculului (Length of panicle) cm	Numărul ramificații/panicul (Number of ramifications/panicle)	Numărul de frunze (Number of leaves)
Linia inițială	15	16	9	22	3
90	9	14	12	26	7
91	4	14	5	29	10
92	28	39	22	24	11
93	6	25	8	20	8
94	8	16	9	15	7

92, s-au stabilit coeficienții de variabilitate semnificativi; cu totul alta se prezintă situația după fenotipul proteic. Procentul tipicității (40%) este inferior (fig. 3).În același timp tipicitatea de 100% după fenotipul proteic al variantei somaclonale 94

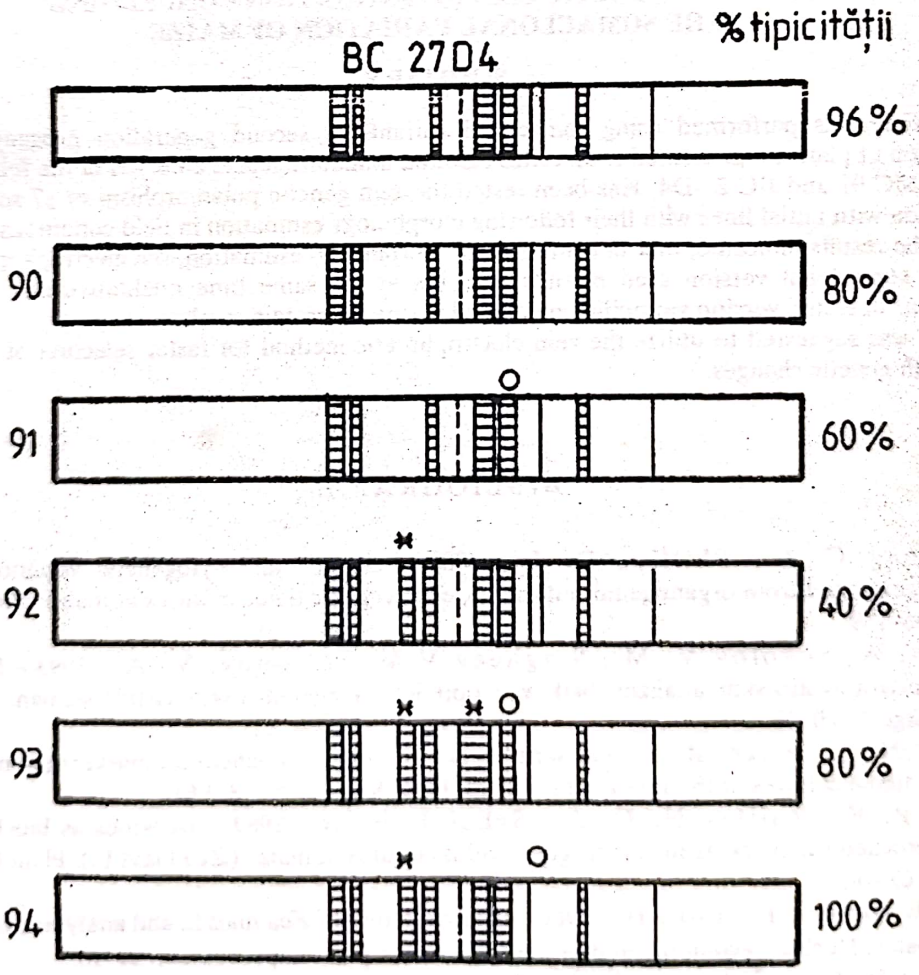


Fig. 3 – Spectrele electroforetice ale zeinei la variantele somaclonale ale liniei BC 27-D4
(Electrophoretic spectrum of zein in somaclonal variants of line BC 27-D4)

corespunde complexului coeficienţilor de variabilitate ai indicilor morfobiologici studiaţi – de importanţă mică şi medie (tabelul 3).

După celelalte variante, analiza electroforetică permite evidenţierea atât a fenotipului proteic diferenţiabil (fig. 3), cât şi modificările tipicităţii variantelor studiate (de la 40 până la 100%).

CONCLUZII

▼ Analiza rezultatelor experienţelor efectuate dă posibilitatea stabilirii unei legături între gradul de variabilitate a caracterului morfologic şi spectrul electroforetic al zeinei.

▼ Spre deosebire de aprecierea morfobiologică, analiza electroforetică a boabelor variantelor somaclonale permite efectuarea simultană a aprecierii calitative şi cantitative a variabilităţii şi tipicităţii acestora.

▼ Electroforeza zeinei poate fi folosită pentru aprecierea variantelor somaclonale proprii la porumb în vederea urgentării selecţiei plantelor regenerate genetic modificate.

ELECTROPHORETIC ZEIN INVESTIGATION CONCERNING THE SOMACLONAL VARIATION OF MAIZE

SUMMARY

Study was performed using somaclonal variants of second generation progeny after self-fertilization of plants, regenerated from callus cultured immature maize embryos of the following lines: Poly 17, MC 01 and BC 27-D4. Has been tested the zein genetic polymorphism of 17 somaclones in comparison with initial lines with their following morphology estimation in field conditions.

The results indicated, that in contrast with morphology estimation, the electrophoretic analysis of every somaclonal version seed permits to make at the same time qualitative and quantitative estimations of tested version variability and tipical nature by protein markers.

It was suggested to utilize the zein electrophoretic method for faster selection of regenerated plants with genetic changes.

BIBLIOGRAFIE

Armstrong C. L., Phillips R. L., 1988 – Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. Crop Sci., 28,2: 135–139.

Asâka I. A, Sokolov V. M., Sergheev V V, Trofimov, V. A., 1993 – Ispolzovanie electroforesticeskih analizov belkov v opredelenii gheneticeskoi cistotî semian. Kukuruza i sorgo, 5: 20–23.

Evereft N. P., Wach M. J.,Ashworth D. J., 1985 – Biochemical markers of embriogenesis in tissue cultures of the maize inbred B 73. Plant Sci., 41, 2: 133–140.

Fransz P. F., Ruijter N. C. A., Schel J. H. N., 1989 – Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.). Plant Cell Rep., 8, 2: 67–70.

Göbel E, Brown P., Lörz H., 1986 – *In vitro* culture of *Zea mais* L. and analyses of regenerated plants. Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. 21–28.

Konarev V. Gh., Sidorova V. V., Timofeeva G. I., 1990 – Electroforez zeina kak metod identifikaţii, reghistraţii i analiza sortov, linii i ghibridov kukuruzî. Selskohozleaistvennaia biologhia. 3: 167–177.

Scanned with OKEN Scanner

Larkin P. J., Scowcraft W. R., 1981 – Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60: 197–214.

Lazanyi J., 1988 – Variation of the R_3 generation of CHI-31 maize inbred line after *in vitro* regeneration of immature embryos. Cereal Rez. Comunic. Szeged, 16, 3/4: 251–257.

Mişarin S. I., Mozgova E. A., Monastâreva L. E., et al., 1977 – Sohranenie specificeskih spektrov belkov v kalusnâh kulturah kukuruzî. Doklad Akademii Nauk S.S.S.R. 236: 1273–1279.

Néstický M., 1989 – Somaklonalna variabilita u kukuruce. Sbornik C.S.A.Z. – Ceskol. Acad. Zemed., 127: 34–38.

Novak F. J., Daskalov S., Brunner H., 1988 – Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture technique. Plant Breeding, 101, 1: 66–79.

Novak F. J., Daskalov S., Brunner H., 1988 a – Genetic variability in maize induced by tissue culture techniques. Proc. of the 14th Congr. of the maize and sorghum sect. of Eucarpia, Trnava, 1: 11–16.

Poperelea F. A., Asâka I. A., Kluciko P. E., Sokolov V. M., Trofimov V. A., Sergeev V. V., 1989 – Opredelenie ghibridnosti semian kukuruzî po electroforeticeskim spektram zeina. Dokladî Vashnil, 3: 2–4.

Racchi M. L. Mo Rongda 1991 – Induction of embryogenetic callus from mature tissues of maize: nutritional requirements and GDH isozymes analysis. J. Genet. Breeding, 45, 1: 39–43.

Vasil I. K., 1987 – Developing cell and tissue culture systems for improvement of cereal and grass crops, J. Plant Physiol., 128: 193–218.

Scanned with OKEN Scanner

EXPRIMAREA FENOTIPICĂ A ACȚIUNILOR GENETICE EPISTATICE LA PORUMB

I. HAȘ, I. CĂBULEA, C. GRECU,
VOICHIȚA HAȘ*

În ereditatea principalelor caractere și însușiri la porumb, efectele de aditivitate și dominanță au o importanță deosebită, dar nici rolul efectelor epistatice nu poate fi neglijat. În accepțiunea geneticii cantitative, efectele epistatice includ:epistaziile propriu-zise, complementaritatea, acțiunile modificatoare ale genelor, criptomeria (Moreno-Gonzales și Dudley, 1981). Hallauer și Miranda (1981) subliniau că pentru caracterele cu determinism cantitativ al eredității, epistazia este un termen pur statistic. Varianța epistatică este rezultanta porționării ortogonale a interacțiunii dintre locusuri (interacțiune interalelică). Efectele epistatice sunt efecte neaditive între gene situate la locusuri diferite, în contrast cu efectele de dominanță care sunt urmare a neaditivității la nivelul unui locus.

Cele mai multe dovezi cu privire la rolul efectelor epistatice în determinismul producției, rezistenței la helminthosporioză a unor caractere ale știuletului și plantei la porumb, au fost obținute prin analize ale generațiilor medii, incluzând populații genetice cu grade diferite de homozigoție (Gamble, 1962 a, 1962 b; Hughes și Hooker, 1971; Darrah și Hallauer, 1972).

Efecte epistatice au fost detectate la porumb și prin examinarea relației dintre nivelul de heterozigoție și performanțele unor caractere cantitative; prezența efectelor epistatice a făcut ca relația „grad de heterozigoție – producție" să nu fie liniară în cazul studiului unui sistem dialel realizat pe baza a șapte linii consangvinizate, precum și populațiile F_2, F_3, backcross, – autopolenizat, cu patru niveluri de heterozigoție (0, 25, 50 și 100%) (Martin și Hallauer, 1976).

Importanța relativă a epistaziei a fost remarcată prin compararea producțiilor observate și prognozate la hibrizii triliniari și dubli, cu cele ale hibrizilor simpli neparentali pe baza cărora s-au realizat prognozele (Sprague și Thomas, 1967; Eberhart și Hallauer, 1968; Otsuka și colab. , 1972; Stuber și colab., 1973; Schnell și Singh, 1978; Pfarr și Lamkey, 1992). După Halauer și Miranda (1981), performanțele unor hibrizi simpli se datoresc complexului unic de relații epistatice ce se stabilesc între liniile consangvinizate elită componente ale acestor hibrizi.

*Stațiunea de Cercetări Agricole – Turda

Scanned with OKEN Scanner

Obiectivele prezentului studiu au fost de a afla importanţa efectelor epistatice în determinismul eredităţii capacităţii de producţie pentru grupe de precocitate ale materialului biologic utilizat în lucrările de ameliorare pentru zona cu condiţii termice mai limitate pentru cultura porumbului şi de a găsi posibilităţi de reducere a efectelor epistatice negative pentru hibrizii triliniari realizaţi pe bază de prognoze.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Datele din prezentul studiu provin din experienţe, organizate în perioada 1985–1993 la Staţiunea de Cercetări Agricole Turda. Valorile pentru efecte genice au fost calculate după modelul statistic propus de Gamble (1962 a) la populaţiile medii P_1, P_2, F_1, F_2, BK_1, BK_2) generate de încrucişări între trei perechi, respectiv şapte perechi de linii consangvinizate. Pentru primul set, experimentarea s-a făcut la 40 000, respectiv 80 000 plante/ha, iar pentru setul al doilea – la 70 000 plante/ha.

Diferenţele între producţia observată şi cea prognozată la hibrizii triliniari s-au calculat pe baza datelor obţinute în patru culturi comparative. Hibrizii simpli pentru prognoză şi hibrizii triliniari au fost obţinuţi cu forme materne provenite din trei linii consangvinizate cu perioada de vegetaţie mijlocie: RT 223, RT 291 şi W 182 B. Ca forme paterne au fost utilizate pentru hibrizii simpli şi triliniari, din fiecare cultură comparativă, trei linii consangvinizate: una timpurie (FAO 230–300), una cu perioada de vegetaţie asemănătoare liniilor consangvinizate utilizate ca forme materne (FAO 300–400), a treia – mai tardivă decât liniile materne (FAO 400–600). Pentru diversificarea condiţiilor de experimentare, cu intenţia de a crea condiţii mai favorabile de exprimare a potenţialului productiv al hibrizilor, experimentarea s-a făcut la 50 000, 70 000, respectiv, 90 000 plante/ha.

Deviaţiile epistatice apărute la hibrizii triliniari au fost calculate după formula:

$$E_{(A\times B)\times C} = \frac{HS_{A\times C} + HS_{B\times C}}{2} - HT_{(A\times B)\times C}$$

(Schnell şi Singh, 1978)

Efectele capacităţii specifice de combinare în hibrizii triliniali (datorate interacţiunii dintre linia consangvinizată paternă şi gameţii segreganţi ai hibridului simplu matern) au fost calculate ca abaterea producţiei hibrizilor triliniali observaţi de la regresia „producţia observată funcţie de producţia prognozată“:

Efecte $CSC = \hat{y} - y_{HT}$ (Schnell şi Singh, 1978)

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Valorile prezentate în tabelele 1 şi 2 şi datele pe baza cărora s-a realizat figura 1, au fost calculate pe baza producţiei de boabe STAS exprimată în grame pe plantă; de aici aparenţa unor producţii mai reduse la densitatea de 80 000 plante/ha.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Media valorilor a șase efecte genetice pentru producția de boabe
(Mean values of the genetic effects for kernels yield)

(Turda, 1985)

Combinația hibridă (Hybrid combination)	Număr pl./ha	Efecte genetice (Genetic effects)						
		m	a	d	aa	ad	dd	h_e^1
RT 10 × W 182 B	40 000	131,45***	16,48**	169,86***	45,16**	45,82***	–11,60°	113,10
	80 000	76,82***	–1,40	38,98***	–17,12°°	8,42*	80,68***	136,78
FV 120 × PI 187	40 000	109,91***	–10,24	214,34***	96,20***	–13,06°°	–2,40	115,74
	80 000	66,48***	–0,78	56,52***	5,96	1,34	87,12***	117,68
PI 187 × A 344	40 000	131,65***	–1,10	174,84***	34,24*	–3,66	–35,80°°	104,80
	80 000	70,13***	17,94***	105,84***	32,000**	26,82***	28,44**	102,28

1 = h, valoarea efectelor heterotice; h = d + dd - aa (după Moreno – Gonzales și Dudley, 1981)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2

Media valorilor pentru şase efecte genetice în determinismul producţiei de boabe (70 000 plante/ha)
(Mean values of six genetic effects in genetic determinism of kernels yield, 70 000 plants/ha)

(Turda, 1986)

Nr. crt.	Combinaţia hibridă (Hybrid combination)	Efecte genetice (Genetic effects)						
		m	a	d	aa	ad	dd	h_l
1	Fv 7 × W 375 B	104,84***	–20,94°°°	146,13***	39,72***	–1,48	–17,64°°°	88,77
2	W 401 × RF 175	106,77***	–37,94°°°	150,68***	55,84***	–27,46°°°	–90,84°°°	4,00
3	Co 125 R × RT 380 a	102,53***	16,98***	113,80***	19,20*	8,26***	–27,48°°	67,12
4	Sv 952 × S 54	100,70***	–6,30	86,20***	–1,32	4,10	60,48***	148,000
5	DBe 16 × RT 9	92,52***	7,50	45,10***	–23,36°	0,60	90,12***	158,58
6	RT 223 × RT 364	108,40***	–10,84°°°	147,91***	52,40***	4,92	–29,37°°°	66,14
7	Lo3 Berg. × RT 251	98,23***	–5,91	15,73***	–2,20	–11,48°°	30,21***	48,14

l = h, estimarea efectelor heterotice: h = d + dd - aa (după Moreno -Gonzales şi Dudley, 1981)

Scanned with OKEN Scanner

În tabelul 1 sunt prezentate valorile a şase efecte genetice, pentru trei încrucişări între linii consangvinizate, la două densităţi. Efectele medii şi de dominanţă au înregistrat valori absolute ridicate şi foarte semnificative statistic în toate situaţiile analizate. Efectele genetice de aditivitate au avut valori absolute relativ scăzute, fiind semnificative doar în două din cele şase cazuri analizate. Efectele genetice epistatice au avut valori semnificative statistic în 14 cazuri din cele 18 analizate. Numărul ridicat al cazurilor în care efectele epistatice au fost semnificative statistic, precum şi valorile înregistrate de efectele de tipul *dd* la densitatea mare, comparabile cu valorile efectelor genetice pentru dominanţă, atrag atenţia asupra necesităţii reconsiderării rolului efectelor epistatice. Valorile mai ridicate ale evaluărilor pentru efectele epistatice la densitatea mare, confirmate şi de semnalarea prezenţei epistaziilor şi în mod grafic, conform metodei propuse de Martin şi Hallauer (1976) (fig. 1), sunt argumente de care trebuie să se ţină seama şi care obligă să fie redefinit locul efectelor epistatice în determinismul capacităţii de producţie, la porumb, cel puţin pentru grupa de precocitate pentru

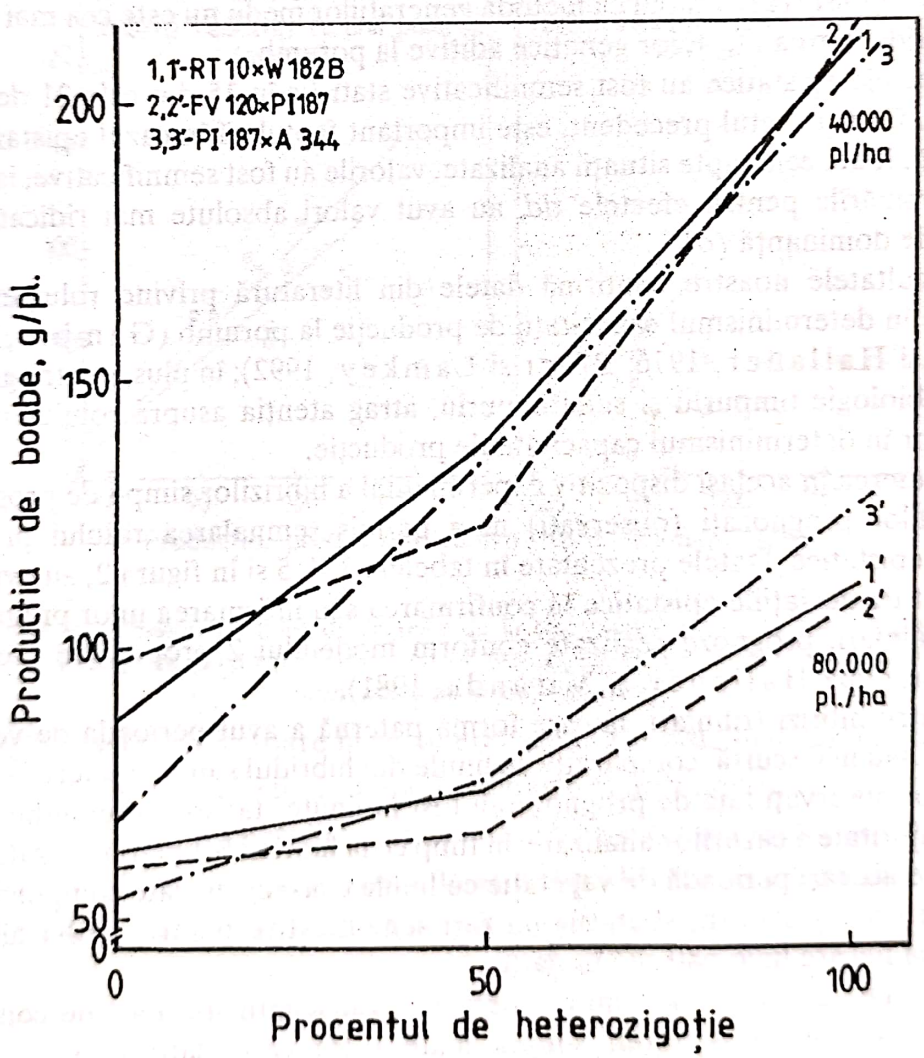


Fig. 1 – Relaţia dintre producţie şi gradul de heterozigoţie generată la încrucişările a trei perechi de linii consangvinizate (Relationship between the yield and heterozigosity degree in backccrosses of three pairs of inbred lines)

care s-a realizat prezentul studiu. Valorile mai ridicate ale evaluărilor efectelor epistatice la densitatea de 80 000 plante/ha ar putea fi urmarea interacţiunii mai strânse dintre condiţiile de mediu şi determinismul genetic la nivel neaditiv, interacţiune semnalată pentru capacitatea de producţie de Căbulea şi colab. (1980).

În anul 1986, pornindu-se de la discriminarea mai eficientă a efectelor epistatice la densităţi mai mari, cât şi datorită volumului mare de determinări în cazul experimentării la două densităţi, studiul populaţiilor medii generate din încrucişarea a şapte perechi de linii consangvinizate, s-a făcut la densitatea de 70 000 plante/ha.

Şi în acest caz efectele medii *(m)* şi efectele de dominanţă *(d)* au fost foarte semnificative statistic în toate cazurile analizate. În patru din cele şapte cazuri au fost semnificative şi efectele aditive *(a),* semnul algebric având importanţă doar legat de liniile consangvinizate parţenere utilizate ca P_1 sau P_2.

Rezultatele noastre sunt în concordanţă cu cele semnalate de Hallauer şi Miranda (1981) care arătau că metoda generaţiilor medii nu este cea mai indicată pentru evidenţierea efectelor genetice aditive la porumb.

Efectele epistatice au fost semnificative statistic în 15 din cele 21 de situaţii analizate. Ca şi în setul precedent, este important faptul că în cazul epistaziilor de tipul *dd,* în toate cele şapte situaţii analizate, valorile au fost semnificative, iar în trei cazuri evaluările pentru efectele *dd,* au avut valori absolute mai ridicate decât efectele de dominanţă *(d).*

Rezultatele noastre confirmă datele din literatură privind rolul efectelor epistatice în determinismul capacităţii de producţie la porumb (Gamble, 1962 a; Martin şi Hallauer, 1976; Pfarr şi Lamkey, 1992); în plus, pentru grupa de material biologic timpuriu şi semitimpuriu, atrag atenţia asupra rolului sporit al epistaziilor în determinismul capacităţii de producţie.

Studierea în acelaşi dispozitiv experimental a hibrizilor simpli de prognoză şi a trilinialilor prognozaţi (observaţi) ne-a permis semnalarea rolului practic al efectelor epistatice. Datele prezentate în tabelele 3, 4, 5 şi în figura 2, au evidenţiat rolul jucat de deviaţiile epistatice în confirmarea sau infirmarea unor prognoze de hibrizi triliniari, prognoze realizate conform modelului 2 propus de Jenkins (1934, citat după Hallauer şi Miranda, 1981).

Pentru hibrizi triliniari, la care forma paternă a avut perioada de vegetaţie mai lungă sau mai scurtă, comparativ cu liniile din hibridul simplu matern, abaterile triliniarilor observaţi faţă de prognoze au fost în limite statistic nesemnificative, în marea majoritate a cazurilor analizate, în timp ce la hibrizii triliniari realizaţi cu linii paterne de aceeaşi perioadă de vegetaţie cu liniile consangvinizate componente ale hibridului simplu matern, abaterile au fost semnificative pentru media hibrizilor realizaţi cu fiecare linie paternă în parte.

Valorile derivaţiilor epistatice şi efectele capacităţii specifice de combinare ale liniei paterne cu hibridul simplu matern (în care datorită segregării şi crossingoverelor au avut loc rearanjări ale materialului genetic nuclear), calculate conform formulelor propuse de Schnell şi Singh (1978) au fost relativ apropiate şi, în general cu acelaşi semn algebric.

Scanned with OKEN Scanner

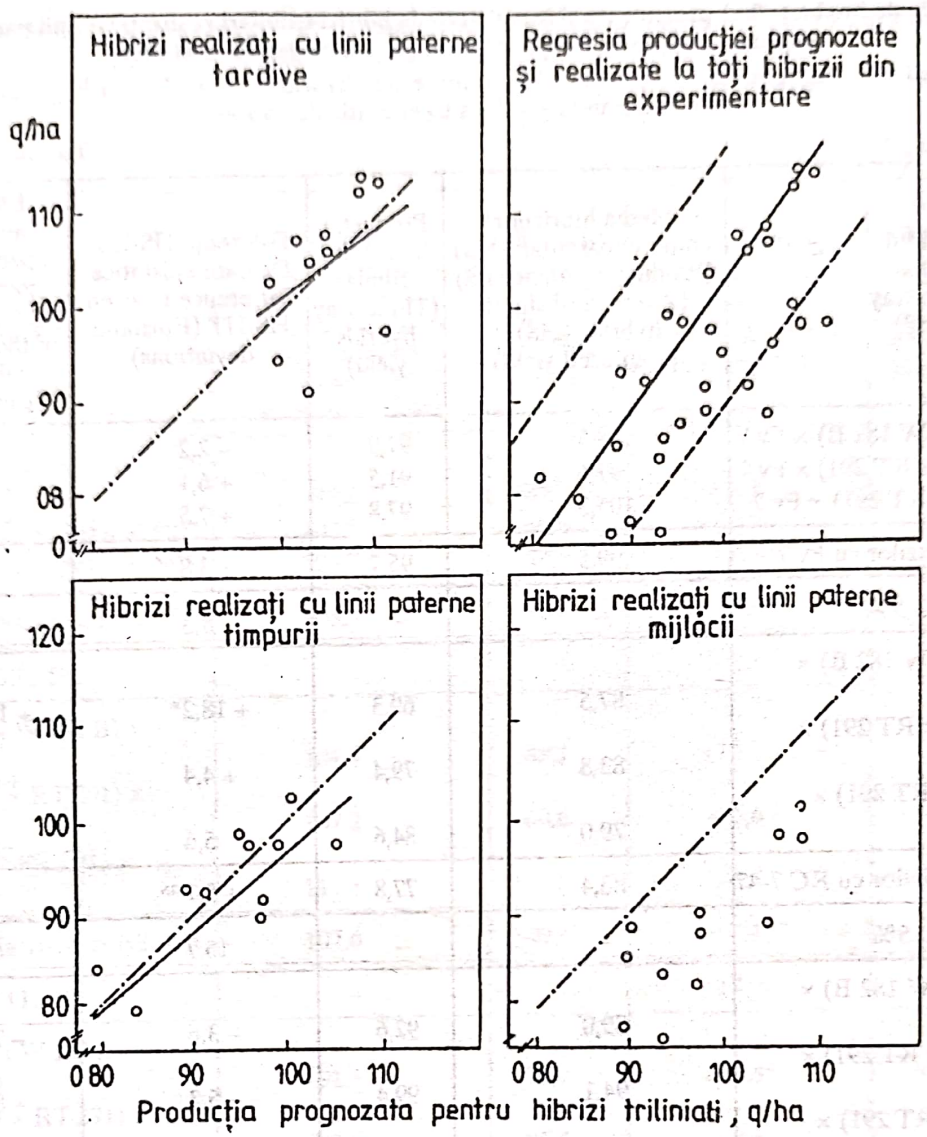


Fig. 2 – Abaterea liniilor de regresie de la bisectoarea axelor de coordonate; capacitatea de producție (Deviation of the regression lines from bisection of coordination axes; yield capacity)

Figura 2 este edificatoare în susținerea celor afirmate mai sus, în sensul că în cazul liniilor paterne mijlocii, dreapta de regresie pentru „producția observată – în funcție de producție prognozată" este situată sub bisectoarea axelor de coordonate; în cazul ideal, când producția prognozată ar fi fost identică cu producția observată, linia de regresie ar fi trebuit să se suprapună bisectoarei.

Observația care se impune este că sporirea eficienței muncii de creare de hibrizi triliniari, pe bază de prognoză, este de dorit a se face utilizând linii consangvinizate paterne cu perioadă de vegetație diferită de liniile consangvinizate componente ale hibrizilor simpli materni. Pentru mărirea gradului de eficiență al prognozării ar fi recomandat ca experimentarea hibrizilor simpli să se facă într-o

Tabelul 3

Producţia de boabe (q/ha) prognozate şi înregistrate la hibrizi triliniari realizaţi cu linii parentale timpurii şi valorile corespunzătoare pentru deviaţiile epistatice

(Prognosed and registered kernel yields (q/ha) in three-way hybrids obtained in early parental lines and corresponding values to epistatic deviations)

Turda, 1987–1988

Hibridul triliniar (Three-way hybrid)	Media hibrizilor simpli neparentali (HS) (Producţia prognozată) (Average of single hybrids (HS), prognosed yield)	Producţia hibridului triliniar (Three-way hybrids yield)	Diferenţa HS-HT Deviaţii epistatice Difference beween HS-HT (Epistatic deviations)	Efectele capacităţii specifice de combinare (CSC) (Effects of the specific combination capacity)
(RT 223 × W 182 B) × Fv 7	95,7	97,9	– 2,2	– 3,7
(W 182 B × RT 291) × Fv 7	97,6	91,5	+ 6,1	+ 3,9
(RT 223 × RT 291) × Fv 7	105,3	97,8	+ 7,5	+ 2,4
Media hibrizilor cu Fv 7	99,5	95,7	+ 3,8 ns	–
D.L. 5%	–	–	8,3	–
(RT 223 × W 182 B) × RC 7-47	87,5	69,3	+ 18,2*	+ 13,9
(W 182 B × RT 291) × RC 7-47	83,8	79,4	+ 4,4	+ 0,3
(RT 223 × RT 291) × RC 7-47	79,0	84,6	-5,6	–9,5
Media hibrizilor cu RC 7-47	83,4	77,8	+ 5,7 ns	–
D.L. 5%	–	–	15,7	–
(RT 223 × W 182 B) × SV 952	89,0	92,6	– 3,6	– 7,5
(W 182 B × RT 291) × SV 952	94,1	99,4	– 5,3	– 8,2
(RT 223 × RT 291) × SV 952	90,9	92,3	– 1,4	– 5,0
Media hibrizilor cu Sv 952	91,3	94,8	– 3,4 ns	–
D.L. 5%	–	–	10,1	–
(RT 223 × W 182 B) × Bucovina 66	97,2	89,1	+ 8,1*	+ 5,8
(W 182 B × RT 291) × Bucovina 66	98,0	97,5	+ 0,5	– 1,4
(RT 223 × RT 291) × Bucovina 66	100,5	102,8	– 2,3	– 3,0
Media hibrizilor cu Bucovina 66	98,6	96,5	+ 2,1 ns	–
D.L. 5%	–	–	8,1	–

Notă: Semnificaţia statistică corespunzătoare „mediei hibrizilor cu ....." a fost apreciată pe baza rezultatelor descompunerilor ortogonale

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4

Producția de boabe (q/ha) prognozate și înregistrate la hibrizii triliniari realizați cu liniile parentale mijlocii și valorile corespunzătoare pentru deviațiile epistatice

(Prognosed and registered kernel yields (q/ha) in three-way hybrids obtained in middle parental lines and corresponding values to epistatic deviations)

(Turda, 1987–1988)

Hibridul triliniar (Three-way hybrids)	Media hibrizilor simpli neparentali (HS) (Producția prognozată) (Average of single non-parental hybrids (HS), prognosed yield)	Producția hibridului triliniar (Three-way hybrid yield)	Diferența HS-HT (Deviații epistatice (Difference HS-HT (Epistatic deviations)	Efectele capacității specifice de combinare (CSC) (Effects of the specific combination capacity)
(RT 223 × W 182 B) × RT 251	96,8	88,7	+ 8,1	+ 6,2
(W 182 B × RT 291) × RT 251	107,6	96,8	+ 10,8*	+ 4,8
(RT 223 × RT 291) × RT 251	105,2	99,3	+6,9	+ 1,5
Media hibrizilor cu RT 251	103,5	94,6	+8,6**	–
D.L. 5%	–	–	8,3	–
(RT 223 × W 182 B) × RT 410	104,4	89,1	+15,3	+ 10,1
(W 182 B × RT 291) × RT 410	107,2	100,6	+ 6,6	+ 1,3
(RT 223 × RT 291) × RT 410	111,1	111,8	–0,7	– 6,1
Media hibrizilor cu RT 410	107,6	100,5	+ 7,1**	–
D.L. 5%	–	–	15,7	–
(RT 223 × W 182 B) × RPI 690	91,5	72,7	+18,8*	+ 15,4
(W 182 B × RT 291) × RPI 690	92,9	85,5	+8,4	+5,4
(RT 223 × RT 291) × RPI 690	92,6	84,6	+8,0	+ 4,8
Media hibrizilor cu RPI 690	92,7	80,9	+11,7**	–
D.L. 5%	–	–	10,1	–
(RT 223 × W 182 B) × W 401	89,7	77,2	+ 12,5	+ 6,5
(W 182 B × RT 291) × W 401	89,6	88,4	+1,2	– 4,8
(RT 223 × RT 291) × W 401	88,4	85,3	+3,1	– 3,5
Media hibrizilor cu W 401	89,2	83,6	+ 5,6*	–
D.L. 5%	–	–	8,1	–

Notă: Semnificația statistică corespunzătoare „mediei hibrizilor cu ....." a fost apreciată pe baza rezultatelor descompunerilor ortogonale

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5

Producţia de boabe (q/ha) prognozate şi înregistrate la hibrizii triliniari realizaţi cu liniile parentale tardive şi valorile corespunzătoare pentru deviaţiile epistatice

(Prognosed and registered kernel yields (q/ha) in three-way hybrids obtained in late parental lines and corresponding values to epistatic deviations)

(Turda, 1987–1988)

Hibridul triliniar (Three-way hybrid)	Media hibrizilor simpli neparentali (HS) (Producţia prognozată) (Average of single nonparental hybrids (HS), (Prognosed yield)	Producţia hibridului triliniar (Three-way hybrids yield)	Diferenţa HS-HT (Deviaţii epistatice) (Difference between HS-HT (Epistatic deviations)	Efectele capacităţii specifice de combinare (CSC) (Effects of the specific combination capacity)
(RT 223 × W 182 B) × RF 211	110,6	98,2	+12,4*	+5,3
(W 182 B × RT 291) × RF 211	101,4	107,2	– 5,8	– 9,4
(RT 223 × RT 291) × RF 211	107,9	112,3	– 4,4	– 10,5
Media hibrizilor cu RF 211	106,6	105,9	+ 0,7 ns	–
D.L. 5%	–	–	8,3	–
(RT 223 × W 182 B) × Mo 17	102,9	91,0	+ 11,9	+ 6,8
(W 182 B × RT 291) × Mo 17	105,2	107,6	– 2,4	– 7,6
(RT 223 × RT 291) × Mo 17	98,8	103,2	– 4,4	– 9,3
Media hibrizilor cu Mo 17	102,3	100,6	+1,7 ns	–
D.L. 5%	–	–	15,7	–
(RT 223 × W 182 B) × RT B 329	110,4	113,8	– 3,4	– 3,1
(W 182 B × RT 291) × RT B 329	119,2	115,5	+3,7	+5,8
(RT 223 × RT 291) × RT B 329	107,5	114,7	– 7,2	– 7,5
Media hibrizilor cu RT B 329	112,4	114,7	– 2,3 ns	–
D.L. 5%	–	–	10,1	–
(RT 223 × W 182 B) × A 632	105,2	106,8	– 1,6	+ 0,1
(W 182 B × RT 291) × A 632	99,6	94,8	+ 4,8	+ 4,8
(RT 223 × RT 291) × A 632	101,8	105,2	– 3,7	– 3,7
Media hibrizilor cu A 632	102,2	102,4	– 0,2 ns	–
D.L. 5%	–	–	8,1	–

rețea ecologică, iar plantele din cultura comparativă să fie semănate în condiții de mărire a competitivității (densități mărite sau fertilizare cu azot în exces).

Crearea hibrizilor triliniari cu ajutorul prognozelor, pe baza rezultatelor experimentării hibrizilor simpli neparentali, a dus la sporirea numărului de hibrizi remarcați de 3–4 ori, comparativ cu situația în care hibrizii triliniari au fost creați doar în baza pedigreului liniilor consangvinizate componente (tabelul 6).

Tabelul 6

Compararea metodelor de creare a hibrizilor triliniari
(Comparing of the creation methods of the three-way hybrids)

Metode de creare a hibrizilor triliniari (Creation methods of the three-way hybrids)	Număr de hibrizi testați (No. of the tested hybrids)	Hibrizi triliniari mai performanți decât media martorilor (More performative three-way hybrids as compared to control average)					
		Capacitatea de producție (yield capacity)		Indice multiplicativ de selecție* (multiplicable selection index)			
		Turda (1993)		Turda (1993)		Rețea ecologică (3–4 localități, 1993) (ecological system) (3–4 places, 1993)	
		Nr. hibrizi remarcați (No. of remanent hybrids)	%	Nr. hibrizi remarcați	%	Nr. hibrizi remarcați	%
Hibrizi triliniari realizați pe bază de prognoză	59	16	27,1	13	22,0	14	23,7
Hibrizi triliniari realizați pe baza genealogiei liniilor consangvinizate componente	188	14	7,4	17	9,0	–	–
Hibrizi triliniari realizați în cadrul programului S.C.A. Turda – firma Nordsaat – Germania	126	12	9,5	8	6,3	–	–
Hibrizi triliniari obținuți în cadrul programului S.C.A. Turda – Institutul porumbului și sorgului Porumbeni – R. Moldova	42	3	7,1	4	3,5	–	–

* Indicele multiplicativ de selecție reprezintă producția de boabe (substanță uscată) obținută de la plantele recoltabile mecanizat (nefrânte).

Scanned with OKEN Scanner

CONCLUZII

▼ Valorile pentru efectele genetice epistatice, calculate prin metoda generaţiilor medii pentru capacitatea de producţie au avut valori semnificative statistic în 77,8% din situaţii pentru trei perechi de linii consangvinizate (experimentarea populaţiilor medii s-a realizat la 40 şi 80 000 plante/ha) şi de 71,4% pentru şapte perechi de linii consangvinizate, în situaţia în care experimentarea s-a făcut la 70 000 plante/ha.

▼ Valorile absolute pentru evaluările efectelor epistatice au fost în unele cazuri apropiate de evaluările pentru dominanţă. Cele mai ridicate valori s-au înregistrat pentru evaluările efectelor epistatice de tipul dd, mai ales în situaţia experimentării în condiţii de densităţi sporite.

▼ Creşterea eficienţei lucrărilor de creare de hibrizi triliniari s-ar putea realiza prin utilizarea unor forme parentale diferite în privinţa perioadei de vegetaţie, combinaţiile hibride urmând a fi realizate în urma studiului hibrizilor simpli într-o reţea cât mai largă, la densităţi care să pună în valoare potenţialul de producţie al hibrizilor.

PHENOTYPICAL EXPRESSION OF GENETIC EPISTATIC EFFECTS IN MAIZE

SUMMARY

Although the epistatic activities have a little spectacular effects comparatively with additive activities they are involved in determinism of somme characters of agroeconomic importance, especially for maize intensive culture.

Analysis of model including F_1, F_2, P_1, P_2 generations and BK_1 and BK_2 backcrosses of three pairs of inbred lines, in experiments with two densities, pointed out frequently the epistatic effects of *aa*, *ad* especially *dd* types.

For a seven pairs of inbred lines the same analysis in an experiment with density of 70 000 plants/ha, indicated that 15 from 21 studied epistatic effects had statistical assured values. It has to be mentioned that the epistatic effects of *dd* type proved to be significant in all the seven analyzed conditions.

The study of the epistatic activities which have been involved in determinism of three-way hybrids against the ordinary prognostic hybrids has been pointed out that when the parental line proceeds from the same vegetation period, the incidence of the epistatic variation is more frequent.

The experimental results show that the utilization of the prognosis for obtaining of three-way hybrids may be considered efficient especially when in backcrosses have been utilized inbred paternal lines with different vegetation period, comparatively with the inbred lines which are the components of the single maternal hybrid.

BIBLIOGRAFIE

Căbulea I., Ocheşanu Constanţa, Nagy Elena, Haş Voichiţa şi Morosan Violeta, 1980 – Cercetări privind posibilităţile genetice de creare a hibrizilor de porumb productivi, timpurii şi rezistenţi la frângerea tulpinilor. Analele I.C.C.P.T. Fundulea, XLVI: 15–24.

Darrah L. L., Hallauer A. R. 1992 – Genetic effects estimated from generation means in four diallel sets of maize inbreds. Crop Science, 12: 615–621.

Eberhart S. A., Hallauer A. R., 1968 – Genetic effects for yield in single, three-way and double cross maize hybrids. Crop Science, 8: 377–379.

Scanned with OKEN Scanner

Gamble E. E., 1962 a – Gene effects in corn (*Zea mays* L.) I. Selection and relative importance of gene effects for yield. Canadian Journal of Plant Science, 42: 339–348.

Gamble E. E., 1962 b – Gene effects in corn (*Zea mays* L.) II. Relative importance of gene effects for plant heigh and certain component attributes of yield. Canadian Journal of Plant Science, 42: 349–358.

Hallauer A. R., Miranda J. B., 1981 – Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University Press, Ames.

Hughes G. R., Hooker A. L., 1971 – Gene action conditioning resistance to northern leaf blight in maize. Crop Science, 11: 180–184.

Martin J. M., Hallauer A.R., 1976 – Relation between heterozygosis and yield for four types of maize inbred lines. Egyptian Journal of Genetics and Cytology, 5: 119–135.

Moreno Gonzales, Dudley J. W., 1981 – Epistasis in related and unrelated maize hybrids determined by three methods. Crop Science, Vol. 21: 644–651.

Otsuka Y., Eberhart S. A., Russell W. A., 1972 – Comparisons of production formules for maize hybrids. Crop Science, Vol. 12: 325–331.

Pfarr D. G., Lamkey K. R., 1992 – Comparison of methods for identifying populations for genetic improvement of maize hybrids. Crop Science, Vol. 32: 670–677.

Schnell F. W., Singh I. S., 1978 – Epistasis in three-way crosses involving early flint and dent inbred lines of maize. Maydica, XXIII: 233–238.

Sprague G. F., Thomas W. I., 1967 – Further evidence of epistasis in single and three-way cross yields in maize. Crop Science. Vol. 7: 355–357.

Stuber C. W., Williams W. R., Moll R. H., 1973 – Epistasis in maize (*Zea mays* L.) III. Signifiance in predictions of hybrid performances Crop Sciences, Vol. 13: 195–200.

Scanned with OKEN Scanner

ACȚIUNI GENICE DETERMINANTE PENTRU REACȚIA PORUMBULUI LA FACTORI DE INTENSIVIZARE (FERTILIZARE, DESIME)

M. MURARIU*

Crearea unor hibrizi de porumb tot mai productivi reprezintă un deziderat major al programelor de ameliorare la această plantă. Un rol important în obținerea noilor genotipuri l-au avut și îl au cercetările de aprofundare genetică pentru stabilirea posibilităților, a căilor și metodelor de ameliorare a unor însușiri deosebit de complexe (Căbulea și colab., 1985). Dintre aceste însușiri face parte și potențialul de valorificare a principalilor factori tehnologici de intensivizare: fertilizarea suplimentară și creșterea desimii plantelor.

În literatura de specialitate, ponderea studiilor genetice privind reacția porumbului la acești factori de intensivizare este relativ redusă: Russel și Machado, 1978; Balko și Russel, 1980 a; 1980 b; Grecu și Ochesanu, 1981; Cosmin și colab., 1984; Sarca și colab., 1984; Căbulea și colab., 1985; Căbulea, 1987.

Russel (1985) sugera necesitatea mai multor studii pentru o mai bună înțelegere a interdependenței dintre desime și fertilizare, astfel încât să devină posibilă fundamentarea unor metode de ameliorare care să permită identificarea de hibrizi ce ar putea utiliza mai eficient fertilizarea și care să reacționeze favorabil la creșterea desimii.

Utilitatea și noutatea studiului genetic realizat la S. C. A. Suceava constă în precizarea acțiunilor genice implicate în determinarea reacției porumbului la fertilizarea suplimentară și creșterea desimii plantelor pentru trei dintre elementele mai importante pentru evidențierea potențialului de valorificare a celor doi factori de intensivizare: producția, frângerea și căderea plantelor și sterilitatea plantelor.

* Stațiunea de Cercetări Agricole Suceava

Scanned with OKEN Scanner

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Examinarea experimentală a reacţiei porumbului la cei doi factori de intensivizare s-a realizat în cadrul unui sistem polifactorial de tipul 3 × 3 × 42, cuprinzând:

- factorul fertilizare cu N–P_2O_5–K_2O, în raport 1:1:1, cu 3 graduări: 60–90–120 kg s.a./ha;
- factorul desime, cu trei graduări: 70–90–110 mii plante/ha;
- factorul genotip, reprezentat de cele şapte linii consangvinizate şi cei 42 de hibrizi simpli F_1 rezultaţi din sistemul dialel p(p–1) de încrucişare a liniilor consangvinizate.

În literatura de specialitate străină şi autohtonă acţiunea factorului fertilizare la porumb este adeseori asimilată cu acţiunea factorului azot, motiv pentru care, şi în această lucrare, acţiunea factorului fertilizare este uneori asimilată cu acţiunea factorului azot.

Experienţa a fost amplasată după metoda parcelelor subdivizate, ceea ce a permis separarea acţiunii factorilor principali, a interacţiunilor duble şi a triplei interacţiuni. Ca urmare a diferenţelor vegetative pronunţate, liniile consangvinizate şi hibrizii F_1 au constituit experienţe distincte, evitându-se astfel competiţia neloială dintre cele două categorii de genotipuri. Materialul biologic a fost cultivat în condiţii de câmp în perioada 1992–1993 (ani semnificativ diferenţiaţi din punct de vedere climatic).

Pentru evidenţierea potenţialului de valorificare a celor doi factori de intensivizare s-au luat în considerare următoarele elemente:

- producţia (q/ha);
- frângerea şi căderea plantelor (arcsin $\sqrt{\%}$);
- sterilitatea plantelor (arcsin $\sqrt{\%}$).

Prelucrarea şi interpretarea rezultatelor obţinute s-au realizat prin analiza generală a variantelor corespunzătoare sistemului de aşezare cu parcele subdivizate (Ceapoiu, 1968). Analiza genetică pentru cele trei elemente luate în considerare s-a realizat în conformitate cu modelele propuse de Hayman (1954) şi Griffing (1956), adaptate pentru analiza unor însuşiri de tip sistemic de Căbulea (1983). S-au cuantificat acţiunile genice aditive, citoplasmatice (materne), interacţiunile genice şi interacţiunile citoplasmă × gene nucleare. Pe această bază s-au făcut câteva aprecieri asupra posibilităţilor de ameliorare a potenţialului porumbului de valorificare a celor doi factori de intensivizare.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analiza generală a variantelor corespunzătoare sistemului experimental 3 × 3 × 42 (tabelul 1) evidenţiază următoarele aspecte:

- acţiunea nesemnificativă a factorului azot pentru toate cele trei elemente analizate (aceasta poate fi pusă pe seama resurselor termice limitate de la Suceava care limitează acţiunea acestui factor);

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Analiza generală a variantelor din sistemul experimental 3 × 3 × 42 pentru elementele analizate

(Main analysis of the variants in experimental system 3 × 3 × 42 for analyzed elements)

(Suceava, 1992–1993)

Sursa variaţiei (Source of variance)	GL (Free degrees)	Producţia (Yield), q/ha s^2	Sterilitatea plantelor (Plant sterility) arcsin $\sqrt{\%}$ s^2	Frângerea şi căderea plantelor (Plant lodging) arcsin $\sqrt{\%}$ s^2	Fp: 5%; 1% (LSD: 5%; 1%)
Total	755	–	–	–	–
Repetiţii (ani)	1	–	–	–	–
N (azot)	2	538	79	289	(19,00; 99,00)
Eroare N	2	177	111	264	
D (desime)	2	45 730**	4 217**	7	(19,33; 99,33)
N × D	4	407*	71	55	(6,16; 15,21)
Eroare D	6	87	61	164	
H (hibrizi)	41	968	523**	838**	(1,51; 1,80)
N × H	82	28	17	27	(1,35; 1,52)
D × H	82	49	38**	55	(1,35; 1,52)
N × D × H	164	34	18	28	(1,25; 1,37)
Eroare H	369	43	24	49	

• acţiunea distinct semnificativă a factorului desime pentru producţie şi pentru sterilitatea plantelor şi nesemnificativă pentru frângerea şi căderea plantelor;

• diferenţierea distinct semnificativă a genotipurilor (hibrizi simpli) pentru cele trei elemente analizate (producţia, sterilitatea plantelor, frângerea şi căderea plantelor);

• dintre interacţiuni se remarcă interacţiunea semnificativă azot × desime pentru producţie şi interacţiunea distinct semnificativă desime × hibrizi pentru sterilitatea plantelor, restul interacţiunilor duble şi interacţiunea triplă fiind nesemnificative.

Din moment ce genotipurile au o acţiune distinct semnificativă, este de aşteptat ca şi la nivel genetic acestea să evidenţieze acţiuni şi interacţiuni genice semnificative. Analiza variantelor genetice corespunzătoare elementelor analizate este prezentată în tabelul 2. Se constată, pentru fiecare din cele trei elemente, ponderea foarte ridicată a acţiunilor genice aditive, asigurate statistic distinct semnificativ, urmată de cea a interacţiunilor genice, de asemenea distinct semnificative şi de acţiunile citoplasmatice asigurate semnificativ pentru producţie, distinct semnificativ pentru sterilitatea plantelor şi nesemnificativ pentru frângerea şi căderea plantelor. Interacţiunile citoplasmă × nucleu prezintă cele mai scăzute valori şi neasigurate statistic pentru producţie şi sterilitatea plantelor. În schimb, pentru frângerea şi căderea plantelor, interacţiunile genice prezintă o valoare mai mare decât valoarea acţiunilor citoplasmatice şi asigurată distinct semnificativ.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2

Ponderea şi semnificaţia varianţelor genetice pentru elementele analizate
(Weight and semnification of the genetic variance for analysed elements)

(Suceava, 1992–1993)

Sursa variaţelor (Source of variance) / Elementele analizate (Analyzed elements)	Varianţa genetică totală (Total genetic variance), s^2	Acţiuni genice aditive (Additive genic activity), s^2	Interacţiuni genice (Genic interaction) s^2	Acţiuni citoplasmatice (Cytoplasmatic activity), s^2	Interacţiuni citoplasmă × nucleu (Interactions cytoplasm × nucleus) s^2	Eroare genetică (Genetic error) s^2
GL	41	6	14	6	15	369
Producţia (q/ha)	2204,86	315,48**	19,64**	3,67*	1,00	2,42
Sterilitatea plantelor (arcsin √%)	1190,67	159,58**	12,21**	5,05**	2,13	1,34
Frângerea şi căderea plantelor (arcsin √%)	1908,41	259,83**	14,92**	5,00	7,37**	2,71

Tabelul 3

Acţiuni genice şi citoplasmatice (materne) ale formelor parentale pentru elementele analizate
(Additive genic and cytoplasmic (maternal) activities of the parental lines for analyzed elements)

(Suceava, 1992–1993)

Liniile parentale (Parental lines)	Acţiuni genice aditive (Additive genic activities)			Acţiuni citoplasmatice (Citoplasmic activities)		
	producţia (yield), q/ha	sterilitatea plantelor (plant sterility arcsin √ %	frângerea şi căderea plantelor (plant breaking and lodging), arcsin √ %	producţia q/ha	sterilitatea plantelor arcsin √ %	frângerea şi căderea plantelor, arcsin √ %
Sv 240	6,97***	–5,63°°°	–2,34°°°	0,36	–0,33	–0,33
Sv 94	–4,88°°°	3,37***	5,65***	0,97*	–0,66	0,17
Pr 65	–2,11°°°	1,67**	–5,44°°°	–0,54	1,08	–0,75
Fv 7	8,99***	–5,62°°°	–2,44°°°	0,05	–0,67	0,42
Sv 417	–4,68°°°	1,67**	1,15*	–0,01	–0,08	0,08
S 65	–2,52°°°	3,87***	–4,44°°°	–0,17	0,58	0,08
Co 206	–1,77°°°	0,67	7,86***	–0,66	0,08	0,33
Dl 5%	0,95	1,26	1,06	0,95	1,26	1,06
DL 1%	1,24	1,64	1,39	1,24	1,64	1,39
DL 0,1%	1,59	2,11	1,78	1,59	2,11	1,78

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4

Interacţiuni genice şi interacţiuni citoplasmă × nucleu pentru elementele analizate
(Genic interactions and interactions cytoplasm × nucleus for analyzed elements)

(Suceava, 1992–1993)

Hibridul (Hybrid)	Interacţiuni genice (Genic interactions)			Interacţiuni citoplasmă × nucleu (Interactions cytoplasm × nucleus)		
	producţia (yield), q/ha	sterilitatea plantelor (plant sterility) arcsin √ %	frângerea şi căderea plantelor (breaking), and lodging), arcsin √ %	producţia q/ha	sterilitatea plantelor arcsin √ %	frângerea şi căderea plantelor, arcsin √ %
Sv 94 × Sv 240	2,74	–0,94	4,56*	1,32	0,71	2,33**
Pr 65 × Sv×240	–1,41	–1,24	1,67	–1,19	0,42	1,25
Fv 7 × Sv 240	–6,09°°	–4,57°°°	–1,33	0,52	–0,33	0,08
Sv 417 × Sv 240	–0,30	–1,23	–0,43	0,27	0,58	–1,08
S 65 × Sv 240	1,48	–1,93	–2,84	–0,36	0,58	0,92
Co 206 × Sv 240	3,57	0,77	–1,63	0,31	0,42	–1,83°
Pr 65 × Sv 94	–1,51	0,26	0,17	–0,80	–0,08	–1,25
Fv 7 × Sv 94	1,99	–1,43	–3,33	–0,23	1,67	–1,92°
Sv 417 × Sv 94	1,10	0,27	3,07	–2,12	0,08	–2,58°°
S 65 × Sv 94	–4,25°	4,07**	–2,33	–1,57	1,42	0,42
Co 206 × Sv 94	–0,07	–2,23	–2,14	–0,20	0,42	–1,83°
Fv 7 × Pr 65	3,93*	–1,73	1,26	–0,25	–1,33	0,58
Sv 417 × Pr 65	–0,97	1,47	–4,32°	0,40	–1,42	–0,08
S 65 × Pr 65	0,41	2,77*	2,27	1,15	–0,58	0,92
Co 206 × Pr 65	–0,45	–1,53	–1,05	–0,34	–0,58	0,67
Sv 417 × Fv 7	–2,54	0,27	–0,33	1,03	0,08	–0,08
S 65 × Fv 7	1,83	–2,93°	1,27	0,59	1,42	–0,08
Co 206 × Fv 7	0,88	1,25	2,46	–0,89	–0,08	–2,83°°°
S 65 × Sv 417	3,59	–2,23	0,64	–0,30	–0,58	–2,08°°
Co 206 × Sv 417	–0,87	1,45	1,37	0,78	–0,58	–2,33°°
Co 206 × S 65	–3,06	0,25	0,99	0,37	0,42	–0,33
Dl 5%	3,80	2,63	4,25	2,84	3,19	1,57
DL 1%	4,99	3,44	5,57	3,73	4,19	2,06
Dl 0,1%	6,38	4,41	7,14	4,77	5,36	2,63

Aceasta sugerează un anumit control metabolic asupra frângerii şi căderii plantelor în condiţiile date de intensivizare.

Pe baza considerentelor menţionate anterior se poate aprecia că atât pentru capacitatea de producţie, cât şi pentru sterilitatea şi frângerea şi căderea plantelor, potenţialul de valorificare a celor doi factori tehnologici de intensivizare este preponderent controlat de acţiunile genice aditive. Aceasta demonstrează posibilităţile reale de ameliorare genetică ale acestei însuşiri.

Scanned with OKEN Scanner

Mărimea şi sensul acţiunilor genice aditive şi citoplasmatice (tabelul 3) oferă posibilitatea selecţiei celor mai adecvaţi genitori pentru ameliorarea genetică a caracterelor analizate. Se remarcă în acest sens, valoarea genetică deosebită a liniilor Fv 7 şi Sv 240, care prezintă cele mai ridicate valori în transmiterea potenţialului de valorificare a celor doi factori de intensivizare pentru producţie, cele mai scăzute pentru sterilitate şi printre cele mai scăzute pentru frângerea şi căderea plantelor. Se constată, de asemenea, că în confruntarea hibrizilor cu factorii de intensivizare, liniile S 65, Sv 94 şi Pr 65 determină accentuarea sterilităţii plantelor, iar liniile Sv 94, Co 206 şi Sv 417 măresc sensibilitatea plantelor la frângere şi cădere. În ce priveşte efectele citoplasmatice se remarcă doar linia Sv 94 care, în calitate de genitor, este mai valoroasă ca mamă decât tată.

Acţiunile genice neaditive determinate de interacţiunile genice, precum şi interacţiunile citoplasma × nucleu (tabelul 4) evidenţiază aporturile, foarte diferite în sens pozitiv şi în sens negativ ale acestora, în determinarea potenţialului de valorificare a celor doi factori de intensivizare.

Valorile tuturor acestor acţiuni genice, cumulate pentru fiecare hibrid simplu în parte şi adăugate la media valorilor din sistemul de încrucişări pot determina o apreciere mai exactă a motivaţiilor pentru care hibrizii simpli au valorificat în mod diferenţiat cei doi factori de intensivizare. Pe de altă parte, alături de avantajul important al înţelegerii mecanismelor genetice care condiţionează nivelul de exprimare al elementelor analizate, un alt avantaj este cel al realizării condiţiilor pentru prognozarea celor mai buni posibili hibrizi trilineali dintre toţi hibrizii parte integrantă a sistemului de încrucişări.

CONCLUZII

▼ Ponderea ridicată şi semnificaţia acţiunilor genice aditive în exprimarea potenţialului general de valorificare a celor doi factori tehnologici de intensivizare atestă, pentru toate cele trei elemente analizate, posibilităţile reale de ameliorare ale acestei însuşiri.

▼ Stabilirea mărimii şi a sensului acţiunilor genice implicate în determinarea reacţiei porumbului la fertilizarea suplimentară şi creşterea desimii plantelor oferă posibilitatea unei înţelegeri mai aprofundate asupra motivaţiilor pentru care hibrizii simpli experimentaţi valorifică în mod diferenţiat cei doi factori de intensivizare.

▼ Cuantificarea acţiunilor genice aditive şi citoplasmatice a interacţiunilor citoplasmă × nucleu evidenţiază atât valoarea genetică a formelor parentale, cât şi valoarea genetică a interacţiunii acestora. Aceste aspecte sunt deosebit de importante pentru eficientizarea procesului de ameliorare în direcţia creării unor hibrizi cu o reacţie favorabilă la fertilizarea suplimentară şi creşterea desimii plantelor.

Scanned with OKEN Scanner

DECISIVE GENETIC ACTIVITY FOR MAIZE RESPONSE TO THE INTENSIFICATION FACTORS (FERTILIZATION, DENSITY)

SUMMARY

A number of 42 single crosses resulted from a p(p-1) dialelel system of crosses among 7 stable maize inbreds, morphologically and physiologically differentiated were comprised in a split plot polyfactorial experimental system in which the dynamic factors were three levels of mineral N fertilization (60, 90, 120 kg a.i./ha) and three levels of plant populations (70, 90 and 110 × 10^3 plants/ha).

Yielding ability, considered as a result of all plant metabolic activities, and plant barrenness and resistance to root and stalk lodging as physiologic indicators of particular interest were recorded.

Additive, non-additive, cytoplasmic and nucleocytoplasmic effects were estimated. The high weight of the additive genetic variances in the expression of the general potential of utilization of the two crop intensification factors certified the real possibilities for the breeding of this trait.

Prediction of the three way crosses with the highest potential of utilization of the two crop intensification factors is suggested in order to increase the efficiency of the breeding process.

BIBLIOGRAFIE

Balko L. G., Russel A. W., 1980 a – Effect of rates of nitrogen fertilizer on maize inbred lines hybrid progeny. I. Prediction of yield responses. Maydica, 25 : 65–79.

Balko L. G., Russel A. W., 1980 – Effect of rates of nitrogen fertilizer on maize inbred lines and hybrid progeny. II Correlations among agronomic traits. Maydica, 25 : 81–94.

Căbulea I., 1983 – Unele aspecte statistice ale analizei genetice a capacităţii de producţie. Probl. genet. teor. aplic., XV, 1; 31–47.

Căbulea I., Ocheşanu Constanţa şi Moroşan Violeta, 1985 – Determinismul genetic al capacităţii de valorificare a unor factori tehnologici (fertilizarea cu azot şi spaţiul de nutriţie) la porumb.

Căbulea I., 1987 – Unele aspecte ale orientării lucrărilor de ameliorare a porumbului . Volum omagial. Redacţia de propagandă tehnico-agricolă, Extras.: 169–187.

Ceapoiu N., 1968 – Metode statistice aplicate în experienţele agricole şi biologice. Ed. Agro-Silvică, Bucureşti.

Cosmin O., Bica N., Sarca Tr., Ceocazanu I., Restea T., Suba T., Ilicevici S., Munteanu Gh., Chirvăsoiu Emilia, 1984 – Relaţia genotip – densitate şi implicaţiile ei în lucările de ameliorare a porumbului. Probl. genet. teor. aplic. XVI, 4: 267–296.

Grecu C., Ocheşanu Constanţa, 1981 – Câteva aspecte privind implicaţiile genelor „lg1" şi „lg2" în ameliorarea porumbului. Probl. genet. teor. aplic. XIII, 5: 251–260.

Griffing B., 1956 – Concept of general and specific combining ability in relation to dialel crossing system Austral j. Biol. Sci. 9: 463–493.

Hayman B. Y., 1954 – The analyses of variance of diallel tables. Biometrics 10: 235–243.

Russel W. A., Veronica Machado. 1978 – Selection procedures in the development of maize inbred lines and the effects of plant densities on the relationships between inbred traits and hybrid yields. Iowa Agric. Home. Econ. Exp. Stn. Res. Bull., 585.

Russel W. A., 1985 – Comparison of the hybrid performance of maize inbred lines developed from the original and improved cycles of BSSS. Maydica, XXX: 407–419.

Sarca Tr., Neguţ C., Munteanu Gh., Mihalache M., 1984 – Influenţa portului frunzelor şi a înălţimii plantelor de porumb asupra capacităţii de producţie la diferite densităţi. Probl. genet. teor. aplic., XVI, 4: 297–317.

Scanned with OKEN Scanner

BIFURCAREA TULPINII LA PORUMB – CARACTER EREDITAR

V. E. MICU, E. C. PARTAS*

În prezent, porumbul este una dintre plantele cele mai studiate sub raport genetic. Au fost descrise şi identificate mutaţii, care modifică structura şi funcţia organelor vegetative a porumbului (Coe şi colab., 1988), însă mutante de porumb cu tulpina bifurcată sunt rar întâlnite şi puţin studiate. În urma investigaţiilor orientate spre menţinerea şi identificarea mutantelor spontane la porumb, desfăşurate pe parcursul anilor 1963–1993, au fost colectate şi păstrate mutante aparţinând la 85 clase fenotipice (Coe, 1988; Diaconu, 1970; Micu, Captari, 1973; Mouli, 1970; Troyer, 1976).

GENITORI. DESCRIEREA FENOTIPICĂ A MUTANTEI

Mutante cu tulpina bifurcată „dib" au fost depistate în nouă surse de diferite origini, printre acestea se află populaţii locale, o linie şi două surse genetice de provenienţă hibridă (tabelul 1). Este necesar să menţionăm, că în colecţiile de cultivare şi genitori n-au fost aplicaţi agenţi mutagenici. Trebuie însă menţionat că unele genotipuri au fost însămânţate cu seminţe păstrate timp de 4–5 ani sau obţinute din alte zone climatice.

Mutanta a fost descrisă şi menţinută în sursa K 2858, care a fost încrucişată: *sib* cu genotipuri „dib" homo- şi heterozigote şi cu mai multe linii consangvinizate şi surse genetice. Hibrizii obţinuţi au fost autopolenizaţi. În generaţiile ulterioare s-a efectuat selecţia descendenţilor cu o rată ridicată de mutante.

Simbolul propus pentru a distinge mutanta de altele este „dib" (dichotomously branched stalk). Caracterul distinctiv al mutantei este tulpina bifurcată la unul din nodurile inferioare sau de mijloc (nodul 4–8), mai rar la unul din nodurile tulpinale superioare şi axa principală a paniculului. Cu o frecvenţă mai redusă au fost observate mutante cu bifurcarea dublă a tulpinii, mai întâi la unul

* Institutul de Cercetări Ştiinţifice pentru Porumb şi Sorg, Republica Moldova

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Lista genitorilor „dib" (List of „dib" genitors)

Genitorii (Genitors)	Caracteristici (Characteristics)
K 805	Sticlos alb
K 861	Local din Bulgaria
K 2123	Populația H 5 (Rusia, Novosibirsk)
K 2858	Local din Afganistan
K 2847	Brasilian Blue Flour Corn
K 3493	Vereduna Spat – Grun (Germania)
Co 125	Linie din Canada
Hibrid simplu	Dubleanskaya 9 × Gelber land maize
VIR-42	Hibrid dublu

din nodurile inferioare, apoi la unul din cele superioare (de obicei, la unul și același nod) sau pe pedunculul fiecărui panicul. Astfel de mutante formează trei sau patru panicule (tabelul 2).

Bifurcarea tulpinii este un caracter destul de variabil, chiar și în cadrul aceleiași descendențe unde pot fi depistate mutante cu locul de bifurcare la diferite niveluri. Mutanta cu bifurcarea tulpinii la nodurile inferioare, se distinge de cea cu bifurcarea la nodurile superioare și axa paniculului, prin formarea a două tulpini cu caractere morfologice identice. Ambele tulpini, apărute dintr-un nod inferior al plantei, au un număr egal de noduri (4–6), internoduri, frunze, iar în vârf formează câte un panicul bine dezvoltat. Mutantele cu bifurcarea la nodurile tulpinale superioare par a fi identice celor normale, cu o diferență doar la numărul de panicule. În urma analizei comparative a parametrilor morfologici a plantelor mutante și normale, a fost depistată superioritatea mutantelor, privind

Tabelul 2

Distribuirea mutantelor după locul de bifurcare a tulpinii
(Distribution of the mutants depending on the place of stalk bifurcation)

Locul de bifurcare (Place of bifurcation)	1991	1992	Total plante	
			nr. plante	%
Sub inserția știuletelui	6 697	6 872	13 569	50,4
Mijlocul tulpinii	4 478	4 964	9 443	35,0
Deasupra inserției știuletelui	1 628	982	2 610	9,7
Ultimul nod din vârful tulpinii	680	–	680	2,5
Axa centrală a paniculului	126	75	201	0,7
Bifurcarea dublă a tulpinii cu formarea a:				
4 panicule	88	15	103	0,4
3 panicule	320	25	345	1,3
Numărul plantelor studiate	14 017	12 934	26 951	100,0

Scanned with OKEN Scanner

inflorescenţa masculină, producţia de polen, numărul de frunze şi numărul de ştiuleţi per plantă. Ambele panicule ale mutantei, comparativ cu cel al plantei normale, sunt puţin mai scurte şi formează un număr mai redus de flori, cu antere puţin mai uşoare în greutate (tabelul 3). Formând două panicule, numărul de flori şi cantitatea de polen la plantă se măresc corespunzător cu 65% şi, respectiv, 67%. De regulă, mutantele sunt de o talie puţin mai redusă, frunze mai înguste, ştiuleţi mai mici şi sunt mai sensibile la atacul tăciunelui (*Ustillago zeae*).

ANALIZA GENETICĂ

Pentru a determina mecanismul ereditar al mutantei, au fost studiate mai mult de 5 500 descendenţe, obţinute prin autopolenizarea mutantelor, încrucişarea lor recurentă cu plante normale (*sib*; combinaţii hibride) şi cu diferite mutante.

În urma analizei rezultatelor segregării la descendenţe au fost depistate mai multe particularităţi, necaracteristice eredităţii caracterelor, determinate de gene cu alele recesive, dominante sau interacţiunea genelor. În primul rând, au fost

Tabelul 3

Principalele caractere ale plantelor „dib“ (The main characters of „dib“ plants)

Caractere (Characters)	Planta normală (Normal plant)	Planta „dib“ („dib“ plant)	„dib“, % faţă de normală („dib“ as against to the normal plant)	Numărul de genotipuri studiate (Number of the studied genotypes)
Înălţimea plantei, cm	123,0	99,0	80,5	69
Lungimea frunzei, cm	49,7	49,4	99,4	57
Lăţimea frunzei, cm	6,9	6,2	89,9	57
Numărul de frunze	10,6	14,9	140,6	58
Lungimea ştiuletelui, cm	12,3	8,9	72,4	35
Numărul de ştiuleţi per plantă	1,2	1,8	150,0	69
Lungimea spicului, cm	26,3	24,8	94,3	62
Numărul de flori: în panicul	563,0	491,0	87,2	42
– la o plantă	619,4	1021,0	164,9	67
Greutatea:				
– a 100 antere, g	0,6	0,4	70,5	51
– anterelor dintr-un panicul, g	2,1	1,8	85,7	5
– anterelor la o plantă, g	2,1	3,5	166,7	5
Viabilitatea polenului, %	74,4	80,8	108,6	16
Atacul (%) de:				
U. zeae	2,6	8,2	315,4	1 078
S. reilianum	3,0	1,8	60,0	1 078

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4

Distribuirea descendenţelor consangvinizate după rata mutantelor „dib“
(Distribution of the inbred progenies depending on the rate of „dib“ mutants)

Anii de cercetare (Years)	Rata mutantelor (Rate of mutants), %					Numărul descendenţelor studiate (Number of studied progenies)
	0	1–25	26–50	51–75	76–100	
1969–1984	284	908	275	0	1	1467
1985–1988	117	236	171	23	3	550
1990–1992	165	1336	1005	704	112	3322
Total: nr.	566	2480	1451	727	116	5339
%	10,6	46,5	27,2	13,6	2,29	

analizate descendenţele mutantelor autopolenizate după ciclul trei de consangvinizare (tabelul 4). Ca urmare, au fost depistate atât descendenţe segregante cu o rată a mutantelor de 1–100%, cât şi totalul descendenţelor asemănătoare biotipurilor normale (frecvenţa acestora este de 10,6%). În descendenţele încrucişărilor *sib* (dib × dib/ + şi dib/+ × dib), indiferent de poziţia mutantei, rata mutantelor a fost în limita 1–50%, pe când în cele de la încrucişarea a două mutantei homozigote, rata acestora este mai mare, atingând şi maxima posibilă 100% (tabelul 5). În seria descendenţelor, *sib* (dib × dib) descendenţele reprezentate cu biotipuri normale au avut o frecvenţă de 5,3%, pe când în seria descendenţelor „dib × norm“ frecvenţa a fost de 17,3%.

Tabelul 5

Rata mutantelor „dib“ la descendenţele încrucişărilor sib şi hibride
(Rate of „dib“ mutants in progenies of sib and hybrid crosses)

Încrucişări (Crosses)	Rata mutantelor (Rate of mutants), %					Numărul descendenţelor studiate (Number of studied progenies)
	0	1–25	26–50	51–75	76–100	
sib						
norm. × dib	18,0	57,1	21,8	3,1	0	261
dib × norm.	17,1	65,91	7,1	0	0	41
dib × dib	5,3	42,1	36,8	10,5	5,3	19
hibride						
norm. × dib +	0	43,8	51,6	4,7	0	64
norm.× dib	1,1	48,9	43,7	5,8	0,5	190

Scanned with OKEN Scanner

În seria descendenţelor, obţinute prin încrucişarea genotipurilor mutante cu mai multe linii consangvinizate, rata mutantelor adeseori a fost la limita de 1–50% şi rareori puţin mai ridicată (51–100%). În cazul descendenţelor compuse în totalitate din genotipuri normale frecvenţa mutantelor este mai redusă (0–1,1%) faţă de toate seriile de descendenţe studiate.

În altă serie de încrucişări hibride al mutantei „dib" cu mutantele „tb", „br 2", „ts 2", „ral" ş.a., au fost obţinute descendenţe cu fenotip normal. Însă urmărind dezvoltarea şi fenotipul plantelor, am constatat că mutanta „dib" nu modifică caracterele determinate de acţiunea genelor menţionate şi se transmite descendenţelor independent.

La analiza citologică a numărului de cromozomi în celulele apicale ale sistemului radicular, au fost depistate atât celule cu garnituri cromozomale diploide (2n = 20), cât şi garnituri cu surplus de cromozomi (2n = 21). Cu o frecvenţă mai redusă au fost observate celulele cu garnituri 2n = 20 şi 2n = 19 cu mici segmente de cromozomi în nucleu (Micu, Captari, 1973). Aceste date presupun acţiunea aneuploidiei la manifestarea caracterului vizat, însă rămâne de determinat apartenenţa segmentelor la una din grupele de linkaj.

Rezultatele obţinute ne permit a demonstra că acest caracter (dib) este de natură genetică, însă nu este corelat cu acţiunea factorilor ereditari de origine nucleară.

POSIBILITATEA UTILIZĂRII MUTANTEI „DIB"

Datele incomplete privid mecanismul ereditar al mutantei, complică, într-o măsură oarecare, dar nu fac imposibilă utilizarea ei în programele de ameliorare şi producere a seminţei. Datorită însuşirii valoroase care se manifestă prin cantitatea mai mare de polen viabil, faţă de genotipul normal, mutanta „dib" pare a fi destul de atractivă pentru programele de ameliorare a porumbului. Utilizarea analogilor mutanţi în calitate de polenizatori ar putea micşora suprafaţa de însămânţare a acestora în loturile semincere, mărind în final producţia de seminţe hibride. Pentru aceasta, este necesar să se obţină descendenţe homozigote cu plante mutante. În ultimii ani, au fost selectate descendenţe cu proporţia maximă a mutantelor. Pe parcursul a 6–7 cicluri de consangvinizare şi selecţie recurentă a descendenţelor mutant-consangvinitate, s-au obţinut mai multe familii cu rata mutantelor de 80–90%, relativ stabile din generaţie în generaţie (tabelul 6). Cu toate acestea, în programele de ameliorare a mutantei nu s-a avansat în transferarea mutaţiei la linii consangvinizate, pentru a se crea analogi. Astăzi însă dispunem de unele date privind testarea hibrizilor simpli, creaţi cu participarea mutantei (tabelul 7). Datele obţinute relevă faptul că mutanta nu influenţează negativ asupra producţiei de boabe a hibrizilor, cu excepţia, doar că măreşte sensibilitatea faţă de tăciune (*U. zeae*).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 6

Rata (%) mutantelor „dib" în descendenţele unor linii (din 232 studiate) la ultimele etape de selecţie recurentă

(Rate of „dib" mutants in progenies of some lines (from 232 studied) in the last stages of the recurrent selection)

Linii (Lines)	Etape de selecţie (Selection stages)						
	1985	1986	1987	1988	1990	1991	1992
1 515	51,6	25,0	19,7	–	27,0	52,6	81,5
1 521	51,6	25,0	19,7	–	32,4	63,6	91,7
1 813	3,7	66,6	70,0	24,1	63,1	62,6	93,1
1 818	3,7	66,6	70,0	13,3	66,7	75,0	76,9
1 821	3,7	66,6	70,0	13,3	69,6	100,0	89,3
1 857	3,7	66,6	70,0	22,2	60,0	53,8	78,9
2 201	23,0	50,0	75,0	80,0	63,9	62,1	96,3
2 398	–	–	–	–	25,0	37,5	89,3
2 417	38,4	51,6	25,0	19,2	26,3	50,0	81,1
2 569	29,6	30,0	28,6	19,2	18,2	50,0	76,9
2 572	29,6	30,0	28,6	19,2	38,7	68,7	80,0

Tabelul 7

Manifestarea unor caractere la hibrizii „dib +" (media din 14 hibrizi)

(Manifestation of some characters in „dib +" hybrids (average from 14 hybrids)

Caractere (Characters)	dib +	norm. (normal)	DL 5% (LSD 5%)
Producţia de boabe, t/ha	6,5	6,6	0,25
Perioada de vegetaţie, zile	105,6	106,5	2,2
Atacul de *Ustillago zeae*, %	12,9	9,3	1,4
Numărul de ştiuleţi/100 plante	107,1	107,6	0,9

CONCLUZII

▼ Factorul ereditar „dib" (dichotomously branched stalk) condiţionează dezvoltarea plantei cu tulpina bifurcată.

▼ Mutanta „dib" contribuie la formarea unei cantităţi sporite de polen viabil la o plantă.

▼ Bifurcarea tulpinii este determinată de aneuploidie.

▼ Hibrizii dib/+manifestă caracteristici şi însuşiri egale celor normali, ceea ce atestă posibilitatea utilizării mutantei în programele de ameliorare şi producere a seminţei hibride de porumb.

Scanned with OKEN Scanner

BIFURCATION OF THE MAIZE STALK – A HEREDITARY CHARACTER

SUMMARY

Maize plants with bifurcated stalk have been found out in a genotypes, but only in K 2858 – Local source from Afganistan it has been succeed in keeping and multiplication of these spontaneous mutants. As a rule, bifurcation takes place in 4th–8th node, rarely lower or even in the top of stalk. The both of the branches grow normal, form the leaves, cobs and tassels. The mutant has been called „dib" (dichotomously branched).

There were made multiple backcrosses of „dib" plants, being used maternal and paternal lines with the different genetic markers.

The study of these hybrids during the some generations has been proved that the bifurcation of the stalk and formation of the two panicles is a hereditary character but does not determined by a genetic mutation.

It has been established, by analisys of chromosomes number in somatic cells, that in determination of this phenotype the aneuploidy is involved.

After more generations of selection and backcrosses it has been obtained the lines with 80–100% of bifurcated plants (with two tassels) that makes posible their utilization in seed production.

BIBLIOGRAFIE

Coe E. H. Jr. et al., 1988 – The genetics of corn. G. F. Spraque and J. W. Dudley. Corn and Corn Improvement. Third Edition. Madison: 83–258.

Daniel D., 1962 – Fused leaf sheath and branched stalk in maize. Acta. Biol., V, 13: 89–97.

Diaconu P., 1970 – Radiosensibilitatea unor soiuri şi linii de porumb. An. I.C.C.P.T. – Fundulea, 36: 183–191.

Longwell J. H., et al., 1956 – Tasseless maize. Maize Genet. Coop. Newsletter, 30: 95.

Mangini E., 1947 – Un caso di ramificatione nel mais. Nuovo Giorno Bot. Ital., 54: 802–804.

Micu V. E., 1981 – The genetical studies of maize. Moldova, Kişhinev. Ştiinţa: 231.

Micu V. E., Captari S. G., 1973 – Dichotomous stem branching and absence of tassel as a result of aneuploidy. Genetica (U.S.S.R.), 9, 4: 5–11.

Mouli C., 1970 – Mutagen induced dichotomous branching in maize. J. Hered., 61: 150.

Saric M., 1958 – The effect of irradion on the branching of corn (maize) stalks. United Nations peaceful uses of atomic energy. Proc. second Intern. Conf., Geneva: 27.

Troyer A. F., 1976 – Progress report on lethal leaf spot (lls). Maize Genet. Coop., Newsletter, 50: 100–101.

Scanned with OKEN Scanner

PARTICULARITĂȚILE EREDITĂȚII INSTABILITĂȚII SOMATICE A ENDOSPERMULUI *OPAQUE*$_2$ DETERMINATĂ DE ELEMENTUL REGLATOR B$_g$-3449 LA PORUMB

V. V. KOTERNIAK*

Elementele genetice transpozabile la porumb au fost descoperite de McClintock (1950, 1951) la începutul anilor cincizeci, acestea fiind denumite „elemente de control". Ulterior, au fost depistate elemente asemănătoare și la alte specii. Acești factori pot fi clasificați în diferite familii (sisteme) după criteriul capacității de interacțiune. Capacitatea elementelor mobile de a transpune și a influența expresia genelor determină instabilitatea genetică pe mai mulți loci.

Instabilitatea genetică pe locusul *opaque*$_2$ (o$_2$), controlată de sistemul elementelor transpozabile Bg-rbg, a fost descrisă pentru prima dată de Salamini în anul 1980. Sunt cunoscute diferite alele ale genei Bg, element reglator al acestui sistem, destul de distincte în acțiunea lor asupra elementului receptor (Montanelli și colab, 1984, Motto și colab. 1989).

Alela Bg-3449, comunicată anterior Koterniak (1993), a fost găsită în sursa de instabilitate 3449 o$_2$, care reprezintă descendenții autopolenizați ai hibridului SP 168 o$_2$ × Zpl 2077/54–14 O$_2$. În prezența elementului reglator Bg-3449, alela mutabilă o$_2$ (ulterior denumită o$_2$–m (r), care determină fenotipul opac al endospermului, poate reveni la cea normală. Astfel de reversie duce la restaurarea structurii sticloase a endospermului și se manifestă prin formarea boabelor cu fenotip mozaicat sau, dacă reversia are loc în fazele timpurii ale dezvoltării, prin fenotipl normal (fig. 1).

În lucrarea de față sunt prezentate unele date privind instabilitatea genetică pe locusul *opaque*$_2$ determinată de elementul reglator Bg-3449.

* Institutul de Cercetări pentru Porumb și Sorg, Pașcani, Republica Moldova

Scanned with OKEN Scanner

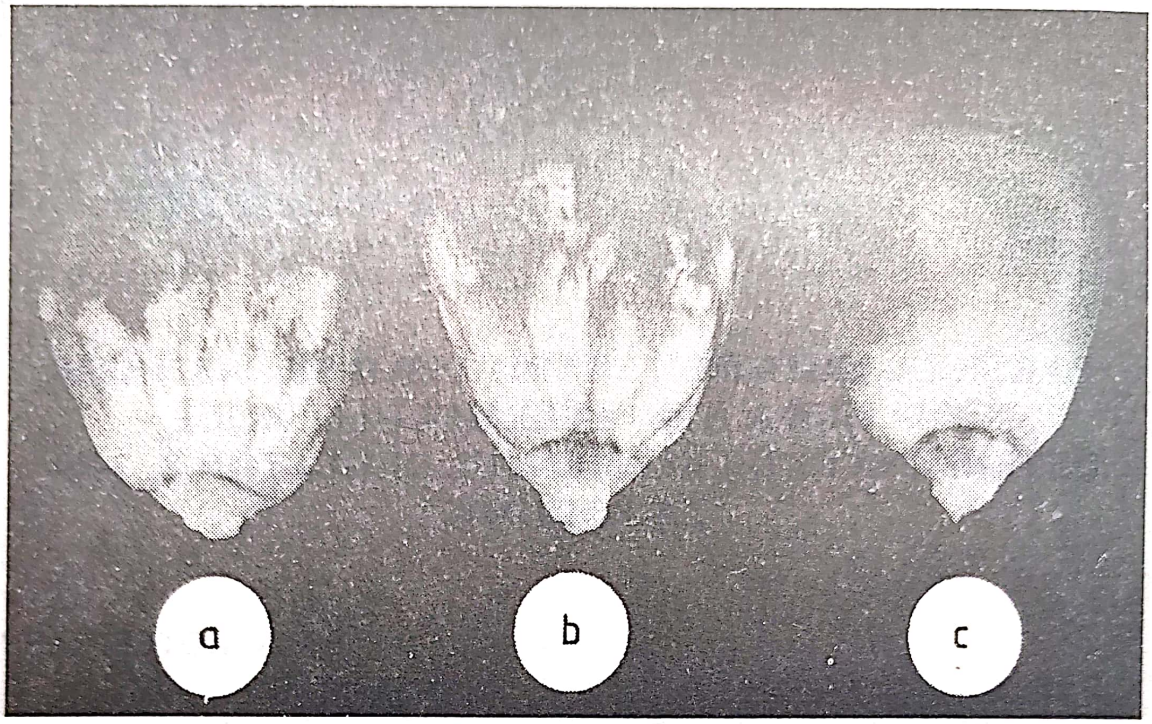


Fig. 1 – Boabe cu fenotipul mozaicat (a, b) şi normale (c) (Phenotype of variegated kernels a, b and normal kernels, c)

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Una din formele parentale ale sursei iniţiale de instabilitate, linia normală Zpl 2077/54–14, spre deosebire de SP 168 o_2, la încrucişări cu forme care conţin alela mutabilă o_2–m (r) provoacă boabe mozaicate în generaţiile autopolenizate, indicând faptul că instabilitatea somatică a sursei iniţiale este condiţionată de linia Zpl 2077/54–14. Pentru evidenţierea caracterului de distribuire a alelei Bg–3449 în această linie au fost încrucişate 53 de plante individuale cu testerul o_2–m (r) $^{+Bg}$, purtător al alelei mutabile o_2–m (r), dar lipsit de alela Bg. Hibrizii F_1 au fost autopolenizaţi (câte 3–5 ştiuleţi fiecare), La ştiuleţii obţinuţi au fost numărate boabele cu fenotip normal, mozaicat şi opac. A fost determinat raportul boabelor normale şi mozaicate faţă de cele opace. Evaluarea semnificaţiei între frecvenţele observate şi cele aşteptate a fost efectuată cu ajutorul testului χ^2.

Valorile de recombinare dintre Bg–3449 şi locusul o_2 s-au calculat după formula:

$$r^2 - 2r + 1 - 4c = 0$$

unde:

r = valoarea de recombinare;

c = raportul boabelor opace la numărul total de boabe de pe ştiulete.

Scanned with OKEN Scanner

Selecția disruptivă după numărul de boabe cu fenotip normal a fost începută la știuleții autopolenizați ai plantelor S_4 proveniți de la sursa inițială de instabilitate 3449 o_2. De la știuleții selectați pentru semănat au fost alese numai boabele mozaicate.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Caracterul de distribuire a elementului reglator Bg–3449 în linia Zpl 2077/54–14

Toți cei 177 știuleți autopolenizați rezultați din testcrosurile plantelor individuale ale liniei Zpl 2077/54–14 cu testerul o_2–m (r)$^{+Bg}$ au conținut boabe normale, mozaicate și opace, arătând că aceste plante au fost homozigote pentru gena Bg–3449. După cum au remarcat Peterson și Salamini (1986); Peterson (1990) în lucrările lor, prezența elementului reglator activ în toate plantele analizate se întâlnește foarte rar.

În majoritatea cazurilor (la descendenți ai 38 din 53 de plante ale liniei Zpl 2077/54–14 în generațiile de autopolenizare a descendenților de la crosuri), s-a observat că raportul boabelor normale și mozaicate față de cele opaque nu se deosebea semnificativ de 15:1 (tabelul 1). Aceasta presupune prezența unui singur element regiator neînlănțuit cu locusul o_2.

Datele din tabelul 1 demonstrează că la descendenții plantelor studiate se întâlnesc știuleți cu raportul boabelor normale și mozaicate față de cele de tip opaque, care nu se abat semnificativ față de 63:1 și 255:1, indicând prezența la plantele respective a 2 și 3 cópii ale elementului reglator. Trebuie menționat că în multe cazuri că la descendenții uneia și aceleiași plante s-au observat știuleți cu raporturi diferite.

Deși știuleții cu raportul analizat apropiat de 3:1 nu au fost depistați, datele segregării boabelor pe unii din ei permit presupunerea linkage-ului parțial dintre elementul reglator și locusul o_2. Astfel, la 14 știuleți (descendenți a 12 plante ale liniei Zpl 2077/54–14) au fost observate raporturile care s-au abătut semnificativ față de toate cele studiate. Cinci din acești știuleți au avut raportul boabelor normale și mozaicate față de cele opace intermediar între 3:1 și 15:1, și pot fi socotite ca descendenții zigoților care conțin o copie a elementului reglator parțial înlănțuită cu locusul o_2. Procentul de recombinare a fost în limitele 28,9–40,9 (tabelul 2).

Trebuie menționat că deși la majoritatea plantelor Bg–3449 a fost prezent numai într-o copie, nu a fost depistat nici un știulete care să conțină acest element în stare heterozigotă. În afară de aceasta, s-a stabilit că inactivarea elementului reglator Bg-3449, ca și inactivarea alelei standard Bg, se întâmplă foarte rar, de aceea, diversitatea observată în distribuirea elementului reglator Bg–3449 este condiționată de capacitatea ridicată de transpozare a acestui element, dar nu și de schimbare a activității lui.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Distribuţia ştiuleţilor rezultaţi din testcrosurile polenizate şi a plantelor analizate ale liniei Zpl 2077/54–14 bazată pe raporturi de segregare a boabelor obţinute din încrucişări autopolenizate o_2–m(r) + Bg × Zpl 2077/54–14 O_2

(Distribution of selfed testcross ears and analyzed plants of inbred Zpl 2077/54–14 based on kernel segregation ratio of selfed crosses o_2–m(r) + Bg × Zpl 2077/54–14 O_2)

Raportul (n + v)/o* (Ratio (n + v)/o*)	Numărul de plante ale liniei Zpl 2077/54–14 (Number of plants of line Zpl 2077/54–14)	Numărul de ştiuleţi autopolenizaţi (Number of selfed cob)
Abateri nesemnificative faţă de:** (Significantly not differed from)		
3:1	–	–
15:1	28	104
63:1	21	59
255:1	10	13
15:1, 63:1	6	–
15:1, 255:1	1	–
63:1, 255:1	10	13
15:1, 63:1, 255:1	1	–
Abateri semnificative de: (significantly differed from)		
3:1, 15:1, 63:1, 255:1	12	14

* n = boabe normale (normal kernels)
v = boabe mozaicate (variegated kernels)
o = boabe opace (opaque kernels)
** P = 0,05%

Tabelul 2

Procentul de recombinare dintre Bg–3449 şi locusul o_2

(Recombination percent between Bg–3449 and o_2 locus)

Numărul plantei liniei Zpl 2077/54–14 (Plant number in Zpl 2077/54–14 line)	Numărul ştiuletului test-crossului (Testcross plant number)	Numărul de boabe normale, mozaicate, opace (Number of normal, variegated, opaque, kernels)	Raportul (n+v)/o [(n+v)/o ratio]	Procentul de recombinare (Recombination percent)
91–5276p305	92–5895–1	322 65 38	10,2	40,2
91–5280p301	92–5945–1	294 51 33	10,5	40,9
91–5281p297	92–5961–2	352 66 40	10,5	40,9
91–5682p71	92–5971–1	228 35 38	6,9	28,9
91–5682p74	92–5977–2	249 45 31	9,5	38,2

Scanned with OKEN Scanner

Frecvența reversiei alelei mutabile o_2–m(r) la cea normală în prezența Bg–3449

În sursa inițială de instabilitate 3449 o_2 numărul de boabe cu fenotip normal a fost egal cu 9% (valoarea medie pe 15 știuleți boabe S_3), cu o variație cuprinsă între 3,5 și 16,9%. Datele obținute arată că frecvența reversiei alelei mutabile poate fi schimbată considerabil cu ajutorul selecției știuleților. Astfel, după doi ani de selecție disruptivă, începută de la forma 89–2111–1 (8,0% de boabe cu consistența normală a endospermului), au fost obținuți știuleți care au avut de la 0,8 la 57,3% boabe cu fenotip normal (știuleții 92–5427–2 și 92–5434–2).

O influență însemnată asupra frecvenței de reversie a alelei mutabile a fost destul de neașteptată, luând în considerare faptul că probele pe care s-a lucrat erau mici (3–12 știuleți). Una din posibilele cauze ale acestui fenomen poate fi translocarea elementului reglator relativ la cel receptiv. Într-adevăr, Montanelli și colabratorii au comunicat despre frecvența de reversie a alelei răspunzătoare o_2–m(r) și valoarea linkage-ului Bg-ului cu locusul o_2, prin care elementul reglator, situat mai aproape de cel receptiv, provoacă numărul mai mare de reversități. Pe de altă parte, luând în considerare dependența activității elementelor reglatoare de gradul lor de metilare, aceasta se poate explica prin influența selecției asupra mecanismelor de metilare ale elementelor de control.

FEATURES OF INHERITANCE OF THE OPAQUE$_2$ ENDOSPERM SOMATIC INSTABILITY DETERMINED BY THE REGULATORY ELEMENT B$_g$–3449 IN MAIZE

SUMMARY

Bg–3449 alele of the Bg-rbg system of controlling element was investigated. The pattern of distribution of this regulatory element in inbred Zpl 2077/54–14 was determined where the studied allele was presented in homozygous state. The major part of analyzed plants contained only one copy of Bg–3449 which was unlinked with the o_2 locus but in some particulary cases partial linkage between them was observed.

Disruptive selection on the number of kernels with normal phenotype showed that the frequency of reversion of the mutable allele o_2–m(r) can be significantly changed, both enhanced and lowered.

BIBLIOGRAFIE

Koterniak V. V., 1993 – A study of a new source of Bg, 67: 90–91.

McClintock B., 1950 – The origin and behaviour of mutable loci in maize. Procl. Natl. Acad. Sci. USA, 36: 344–355.

McClintock B., 1951 – Chromosome organization and genetic expression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 16: 13–47.

Montanelli C., Di Fonzo N., Marotta R., Motto M., Soave C., Salamini F., 1984 – Occurrence and behaviour of the components of the o_2–m(r)–Bg system of maize controlling elements. Molecular and General Genetics, 197, 2: 209–218.

Scanned with OKEN Scanner

Motto M., Thompson R., Di Fonzo N., Ponziani G., Soave C., Maddaloni M., Hartings H., Salamini F., 1989 – Transpositional ability of the Bg-rbg systemof maize transposable elements. Maydica, 34, 2: 107–122.

Peterson P. A., Salamini F., 1986 – A search for active mobile elements in the Iowa stiff stalk synthetic and some derivatives. Maydica, 31: 163–172.

Peterson P. A., 1990 – En (active) in inbred 4Co63. MNL, 64:8.

Salamini F., 1980 – Genetic instability at the opaque$_2$ locus of maize. Molec. Gen. Genet., 179, 3: 497–507.

Scanned with OKEN Scanner

DATE DE PRODUCȚIE A UNOR CLONE DE CARTOF OBȚINUTE PRIN TETRAPLOIDIZARE DIPLOGAMETICĂ GINOIDĂ

I. BOZEȘAN*

După ce Peloquin și Hougas (1958) lansează ideea folosirii formelor haploide în ameliorarea cartofului și fundamentează metodica obținerii în serie a formelor cu 24 de cromozomi (2n = 2x = 24) din cartoful tetraploid (2n = 4x = 48), se declanșează o serie de cercetări privind dirijarea principalilor factori care determină obținerea unei rate cât mai mari de genotipuri cu numărul de seturi cromozomale înjumătățite, precum și perfecționarea continuă a procedeelor expeditive de identificare și alegere a acestor forme (Hougas și Peloquin, 1957; Peloquin și Hougas, 1959; Rothacker și Schafer, 1961; Gabert și colab., 1962; Jakubiec, 1964; Gorea, 1968; 1971 a, 1971 b, 1973). Au urmat apoi studii teoretice cu privire la utilizarea formelor dihaploide ale cartofului în ameliorare (Chase, 1963; Straub, 1964; von Wangenheim, 1967; Gorea, 1973).

Sunt mai puține lucrări care discută scheme de ameliorare cu forme dihaploide, utilizând rezultate experimentale (Gorea, 1968, 1970, 1972). Cu excepția lui von Wangenheim (1967), principiile formulate și schemele concepute au la bază simplificarea structurii genetice prin haploidizare, analiza, combinarea și recombinarea genetică a caracterelor pe treapta diploidă, resinteza treptei tetraploide în finalul schemei de ameliorare.

Tetraploidizarea clonelor dihaploide și a hibrizilor realizați este posibilă pe cale mitotică prin tratamente cu colchicină (Rothacker și Fiedler, 1957; Lebedeva, 1967; Ross și colab., 1967; Gorea și Gologan, 1975) și pe cale meiotică prin polenizarea formelor dihaploide cu parteneri tetraploizi și invers (Gorea, 1972). Sunt însă mai puține date în literatura de specialitate cu privire la manifestarea fenotipică a principalelor elemente ale capacității de producție cauzate de schimbarea gradului de ploidie prin încrucișarea formelor cu număr diferit de seturi cromozomale (Gorea și Gologan, 1975; Gorea și E. Gorea, 1989; Bozeșan și colab., 1991).

* Institutul de Cercetare și Producție a Cartofului, Brașov

Lucrarea de faţă prezintă primele date de producţie ale unor clone poliploidizate diplogametic ginoid din procesul de selecţie, cu scop de a crea soiuri de cartof, utilizând o schemă de ameliorare semianalitică (Chase, 1963; Gorea, 1973).

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Cercetările s-au efectuat pe un număr de 7 clone obţinute prin hibridarea sexuată dintre un dihaploid (2n = 2x = 24) din familia soiului Kastor (Ha. 64.7003/1) şi soiul tetraploid Koretta (2n = 4x = 48). Dihaploidul a fost folosit ca genitor matern. Clonele respective au fost reţinute în urma procesului de selecţie dintr-o populaţie mai mare, întrucât prezentau performanţe accesibile pentru principalele caractere: capacitate mare de producţie, rezistenţă la boli şi dăunători şi calitate bună. Elementele capacităţii de producţie au fost urmărite trei ani consecutivi în culturi comparative şi s-a calculat la ele efectul heterozis în funcţie de rezultatele părintelui cel mai bun, în acest caz soiul tetraploid Koretta (Pena, 1986). S-a urmărit şi o posibilă scădere a fenomenului heterozis pe parcursul generaţiilor de înmulţire vegetativă. Simultan, clonele respective, au fost încercate în culturi comparative urmărind producţia fizică/ha, folosind pentru comparaţie soiurile standard Ostara, Desiree şi Eba. Rezultatele au fost valorificate prin analiza varianţei.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Producţia de tuberculi la clonele tetraploidizate diplogametic ginoid şi selectate ca productive au depăşit în toţi anii nivelul realizat de soiul tată Koretta, astfel:

- în primul an experimental clonele au realizat o producţie fizică cuprinsă între 34,7 şi 41,7 t/ha, depăşind cu 30,5%, respectiv 56,8% producţia soiului Koretta;
- în anul al doilea producţia celor 7 clone a oscilat între 28,2 şi 33,8 t/ha, depăşind producţia soiului Koretta cu 20,5%, respectiv 44,5%;
- în al treilea an producţiile au variat între 26,0 şi 36,5 t/ha, depăşind soiul Koretta cu 19,8%, respectiv 68,2%.

În medie pe cei 3 ani depăşirile de producţie faţă de soiul tată Koretta se cifrează între 24,3 şi 45,2% (tabelul 1).

Şi numărul de tuberculi la cuib a fost mai mare la clonele hibride decât la părintele Koretta (tabelul 2). În medie pe 3 ani numărul de tuberculi la cuib, la soiul Koretta a fost de 10, cu o oscilaţie cuprinsă înre 8 şi 12 tuberculi la cuib, în timp ce la descendenţele selectate a fost cuprins între 14,4 şi 17,3, cu o oscilaţie în cei 3 ani cuprinsă între 10 şi 20 tuberculi la cuib.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Evoluţia producţiei de tuberculi la 7 clone poliploidizate diplogametic ginoid în trei generaţii vegetative consecutive, în comparaţie cu părintele tetraploid Koretta

(Yield evolution of 7 polyploid clones cultivated in three vegetatively propagated generations and the comparison with the tetraploid Koretta parent)

Clona (Clone)	Producţia fizică (yield)							
	Anul I (Ist year)		Anul II (IInd year)		Anul III (IIIrd year)		Media (Average)	
	t/ha	%	t/ha	%	t/ha	%	t/ha	%
Koretta	26,6	100,0	23,4	100,0	21,7	100,0	23,9	100,0
Bv. 86.7625/7	41,7	156,8	32,0	136,8	29,6	136,4	34,3	143,6
Bv 86.7625/47N*	40,4	151,9	30,5	130,3	30,0	138,2	33,6	140,6
Bv. 86.7625/62	39,8	150,0	30,2	129,1	26,0	119,8	32,0	133,9
Bv 86.7625/131	40,2	151,1	33,7	144,0	30,1	138,7	34,7	145,2
Bv. 86.7625/188	39,8	149,6	33,8	144,5	28,7	132,3	34,1	142,7
Bv. 86.7625/244	37,1	139,5	30,0	128,2	36,5	168,2	34,5	144,4
Bv. 86.7625/283	34,7	130,5	28,2	120,5	26,6	122,6	29,7	124,3

* Rezistenţă la nematodul auriu al cartofului (*Globodera rostochiensis Woll.*), patotipul Ro 1

Tabelul 2

Evoluţia numărului mediu de tuberculi la cuib la 7 clone poliploidizate diplogametic ginoid în trei generaţii vegetative consecutive, în comparaţie cu părintele tetraploid Koretta

(Evolution of the average number of tubers/nest at the 7 polyploid clones propagated vegetatively three generations in comparison with tetraploid Koretta parent)

Clona (Clone)	Producţia fizică (yield)							
	Anul I (Ist year)		Anul II (IInd year)		Anul III (IIIrd year)		Media (Average)	
	nr.	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%
Koretta	12,0	100,0	10,0	100,0	8,0	100,0	10,0	100,0
Bv. 86.7625/7	20,0	166,7	13,0	130,0	10,0	125,0	14,3	143,0
Bv. 86.7625/47N*	18,0	150,0	18,0	180,0	15,0	187,5	17,0	170,0
Bv. 86.7625/62	16,0	133,4	14,0	140,0	15,0	187,5	15,0	150,0
Bv. 86.7625/131	17,0	141,7	15,0	150,0	18,0	225,0	16,7	167,0
Bv. 86.7625/188	13,0	108,4	16,0	160,0	14,0	175,0	14,4	144,0
Bv. 86.7625/244	20,0	166,7	16,0	160,0	16,0	200,0	17,3	173,0
Bv. 86.7625/283	19,0	158,4	13,0	130,0	17,0	212,5	16,3	163,0

* Rezistenţă la nematodul auriu al cartofului (*Globodera rostochiensis Woll.*) patotipul Ro1

Scanned with OKEN Scanner

La formarea producţiei efectul heterozis a avut o participare cuprinsă între 26,0 şi 31,8% (tabelul 3). Se observă o scădere a producţiei de tuberculi de la anul I la anul III atât la materialul clonat, cât şi la părintele Koretta. Trebuie semnalată şi o reducere a participării efectului heterozis de la anul I la anul III, respectiv de la 31,8 la 26,0%.

Tabelul 3

Estimarea participării heterozisului la realizarea producţiei de tuberculi – media celor 7 clone, în comparaţie cu părintele tetraploid Koretta

(Estimation of the heterosis influence in yield production – mean of 7 clones in comparison with tetraploid Koretta parent)

Anul experimenal (Year)	Media populaţiei t/ha (Average)	P(4x) – Koretta (t/ha)	Valoarea heterozisului (Heterosis value)		Diferenţa (Difference)
			(t/ha)	(%)	
I	39,0	26,6	12,4	31,8	14,7***
II	31,2	23,4	7,8	25,0	10,0***
III	29,6	21,7	7,9	26,0	6,1***

În cazul numărului mediu de tuberculi la cuib, participarea efectului heterozis a variat de la 32,6 la 46,6% (tabelul 4). Deşi numărul mediu de tuberculi a scăzut de la 17,3 la 15,0, iar la soiul Koretta de la 12 la 8, participarea efectului heterozis la conturarea acestui caracter a fost destul de constantă, semnalându-se chiar o creştere, dar mai puţin semnificativă.

Tabelul 4

Estimarea participării heterozisului la formarea numărului mediu de tuberculi la cuib – media celor 7 clone, în comparaţie cu părintele tetraploid Koretta

(Estimation of the heterosis influence regarding the average number of tubers/nest – mean of 7 clones in comparison with tetraploid Koretta parent)

Anul experimental (Year)	Media populaţiei (nr. tuberculi/ cuib) (Average) population) (no of tubers/nest)	P(4x) – Koretta (t/ha)	Valoarea heterozisului (Heterosis value)		Diferenţa (Difference)
			numărul de tuberculi/ cuib	(%)	
I	17,8	12,0	5,8	32,6	2,31*
II	15,0	10,0	5,0	33,4	3,34*
III	15,0	8,0	7,0	46,6	2,70*

Scanned with OKEN Scanner

Faţă de soiurile martor Ostara (timpuriu), Desiree (semitârziu) şi Eba (târziu), cele 7 clone create prin tetraploidizare diplogametică ginoidă au realizat producţii bune, astfel: soiul timpuriu Ostara a fost depăşit de toate cele 7 clone cu 29,6 până la 51,7%, iar soiul Desiree cu 9,6 până la 27,8%. Faţă de soiul Eba producţiile au fost practic egale cu excepţia clonei Bv. 86.7625/283 care a realizat numai 84,4% din producţia soiului târziu Eba (tabelul 5).

Ross şi Jakobsen au analizat în anul 1976 un vast material rezultat din încrucişări dintre părinţi ortoploizi cu grad diferit de ploidie 2x × 4x şi invers, stabilind cu această ocazie gradul de ploidie al descendenţelor şi principalele caracteristici fenotipice ale lor. Ei găsesc o predominare a formelor tetraploide în proporţie de 90,5%, în încrucişările 2x × 4x, şi stabilesc pentru aceşti descendenţi tetraploizi noţiunea de tetraploizi diplogametici ginoizi, pentru că procesul de dublare a numărului de cromozomi a apărut printr-o restituţie nucleară la nivelul oosferei.

Atât Ross şi Jakobsen (1976) cât şi Wenzel (1979) postulează că variabilitatea genetică într-o populaţie de indivizi tetraploizi diplogametici depinde de nivelul la care a avut loc restituţia nucleară. În cazul când restituţia nucleară a avut loc în prima diviziune reducţională (FDR), respectiv în etapa heterotipică, nu are loc disjuncţia şi segregarea cromozomilor homologi în anafaza I şi cei doi gameţi rezultaţi din această diviziune sunt în linii mari similari, dar heterozigoţi. În cazul când restituţia nucleară are loc în a doua diviziune reducţională (SDR), adică în etapa homeotipică, restituţia nucleară are loc după separarea disjuncţională a

Tabelul 5

Comportarea unor clone selecţionate în culturi comparative, pe o perioadă de trei ani, privind capacitatea de producţie raportată la martorii standard

(The behaviour of some selected clones in 3 years field trials regarding yield capacity in comparison with standard varieties)

Clona (Clone)	Producţia fizică (Yield) t/ha	Ostara (23,0 t/ha)		Desiree (27,3 t/ha)		Eba (35,3 t/ha)	
		Diferenţa (Difference)	%	Diferenţa (Difference)	%	Diferenţa (Difference)	%
Bv. 86.7625/7	34,3	11,3**	149,1	7,0*	125,6	–1,0	97,2
Bv. 86.7625/47 N*	33,6	10,6**	146,1	6,3	123,1	–1,6	95,2
Bv. 86.7625/62	32,0	9,0*	139,1	4,7	117,2	–3,3	90,7
Bv. 86.7625/131	34,9	11,9**	151,7	7,6*	127,8	–0,4	98,9
Bv.86.7625/188	34,1	11,1**	148,3	6,8*	124,9	–1,2	96,6
Bv. 86.7625/244	34,5	11,5**	150,0	7,2*	126,4	–0,8	97,7
Bv. 86.7625/283	29,8	6,8*	129,6	2,8	109,6	–5,6	84,8

D.L. 5% = 6,8; D.L. 1% = 9,2; D.L. 0,1% = 12,2

* Rezistenţă la nematodul auriu al cartofului (*Globodera rostochiensis* Woll.), patotipul Ro. 1

Scanned with OKEN Scanner

cromozomilor homologi, apare segregarea genetică şi gameţii neredu şi formaţi sunt heterogeni dar homozigoţi. Pentru lucrările de ameliorare o deosebită importanţă o are materialul creat pe această cale pentru posibilitatea mai controlată de a dirija caracterele dorite, monogenice şi oligogenice a tetraploizilor, dar mai ales transmiterea fenotipică a componentelor capacităţii de producţie. Ca şi în cazul clonelor selecţionate care au depăşit producţia de tuberculi a părintelui mai productiv Koretta şi chiar pe cele mai productive soiuri martor, Ostara, Desiree şi Eba, Ross şi Jacobsen (1976), au remarcat că tetraploizii diplogametici depăşesc într-un procent foarte mare formele parentale tetraploide în ce priveşte mărimea frunzelor, vigoarea tufei, numărul de tuberculi şi mărimea acestora. Acest fenomen de transgresiune are valori specifice pentru fiecare combinaţie în parte.

Faptul că efectul heterozis participă la formarea producţiei cu numai 26 – 31,8%, şi cu 32,6 – 46,6% pentru numărul mediu de tuberculi la cuib, lasă loc presupunerii că diferenţa poate fi dată de efectul poliploidizării. Gorea şi E. Gorea (1978), discută posibilitatea acţionării efectului combinat între heterozis şi ploidie la descendenţele rezultate din încrucişarea formelor dihaploide de cartof cu polenizatori tetraploizi.

Deşi producţiile de tuberculi au scăzut de la primul an de experimentare în culturi comparative spre anul al treilea, nu poate duce la concluzia unei diminuări a efectului heterozis pe parcursul generaţiilor de înmulţire vegetativă, deoarece în aceeaşi măsură a scăzut şi producţia părintelui teraploid Koretta şi a soiurilor martori, iar contribuţia heterozisului la formarea producţiei nu a scăzut liniar de la anul I la anul al III-lea, mai ales pentru numărul de tuberculi unde s-a semnalat chiar o creştere. Se poate sconta pe o stabilitate a efectului heterozis în procesul de înmulţire vegetativă.

Datele experimentale din culturi comparative arată că materialul de ameliorare creat printr-o schemă cu participarea formelor dihaploide de cartof îndeplinesc pretenţiile cotidiene de producţie pe care le pun producătorii şi consumatorii pentru soiurile noi.

CONCLUZII

▼ Prin încrucişarea formelor dihaploide de cartof cu polen de la soiuri tetraploide, apar cu precădere descendenţi tetraploizi dintre care se pot selecţiona forme cu capacitate de producţie foarte mare.

▼ Clonele tetraploidizate diplogametic şi selecţionate după capacitatea de producţie pot depăşi pentru acest caracter atât părintele cel mai productiv, cât şi soiurile martor Ostara, Desiree şi Eba.

▼ La formarea producţiei o contribuţie însemnată o are efectul heterozis, dar şi alte componente genetice printre care efectul poliploidizării.

▼ Deşi producţia a scăzut de la anul I la anul al III-lea de încercare nu se poate afirma o scădere a efectului de transgresiune heterotică, ci mai repede se

Scanned with OKEN Scanner

poate conta pe o stabilitate heterotică în manifestarea fenotipică a capacităţii de producţie, dacă ea nu este afectată de condiţiile climatice şi de degenerarea virotică.

▼ Datele de producţie ne îndreptăţesc să afirmăm că prin utilizarea formelor dihaploide şi retetraploidizarea lor pe cale meiotică se poate moderniza schema de ameliorare oferind succese în crearea unor soiuri cu însuşiri speciale şi capacitate mare de producţie.

PRODUCTION RESULTS OF SOME POTATO CLONES OBTAINED BY DIPLOGAMETIC GYNODIOECIOUS TETRADIPLOIDIZATION

SUMMARY

This paper presents the yield of some potato clones obtained by meiotic tetraploidization. These clones have been tested in field trails. We present the contribution of heterosis to the potato yield and the evolution of the yield during three generations.

BIBLIOGRAFIE

Bozeşan I., Gorea T., Bianu T., 1991 – Date de selecţie la hibrizii de cartof obţinuţi prin tetraploidizare diplogametică ginoidă. Lucrări ştiinţifice. Anale I.C.P.C. Braşov, Vol. XVIII; (in press.)

Chase S. S., 1993 – Analytic breeding in *Solanum tuberosum L.* A sheme utilizing parthenotoes and other diploid stocks. J. Genet. Cytol. 5.

Gabert A. C., Hougas R. W., Peloquin S. J., 1962 – Haploid frequency in *Solanum tuberosum* L. folowing 4x – 2x matings; superior „pollinators" and superior seed parents. Amer. Potato J. 39..

Gorea T., 1968 – Untersuchungen zur Erzeungung und Zuchterischer Nutzung dihaploider Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.). Inaugural Disertation Universitat Rostock.

Gorea T. 1970 – Fertilitat und Kreuzbarkeit der Dihaploiden von *Solanum tuberosum* L. und deren F1 Bastarden. Zeit. Pflanzenzucht. 64.

Gorea T. 1971 – Influenţa partenerilor de încrucişare asupra frecvenţei dihaploizilor la *Solanum tuberosum L.* Lucrări ştiinţifice. Anale I.C.C.S. Braşov; Cartoful, II.

Gorea T., 1971 – Factorii care influenzează frecvenţa şi distribuţia formelor dihaploide la *Solanum tuberosum L.* Lucrări ştiinţifice. Anale I.C.C.S. Braşov; Cartoful, II.

Gorea T., 1972 – Posibilităţi de încrucişare a formelor dihaploide de cartof. Lucrări ştiinţifice. Anale I.C.C.S. Braşov, Cartoful, III.

Gorea T., 1973 – Eficacitatea unor procedee de selecţie pentru diagnoza timpurie a formelor dihaploide de cartof. Lucrări ştiinţifice. Anale I.C.C.S. Braşov; IV.

Gorea T., 1973 – Crearea formelor dihaploide de cartof şi perspectivele folosirii lor în ameliorare. Probl. genet. teor. aplic., I.C.C.P.T. Fundulea, V., 2.

Gorea T., Gologan Marina, 1975 – Resinteza treptei tetraploide a formelor dihaploide de cartof create prin haplopartenogeză stimulată. Lucrări ştiinţifice. Anale I.C.C.S. Braşov; Cartoful, V.

Gorea T., Gorea Ecaterina, 1978 – Die Phenotypischen Auspragung der Wichtigen Knollenertragskomponenten in der Hybridnachkommenschaften von Ortoploiden Genitoren unterschiedlicher Ploidiestufen. E.A.P.R. – Abstract; Warschau.

Gorea T., Gorea Ecaterina, 1989 – Crearea de forme haploide şi utilizarea lor în ameliorarea cartofului. Producţia vegetală. Horticultura, 5.

Hougas R. W., Peloquin S. J. 1957 – Haploids plant of the potato varieties Katahdin. Nature, London, 180.

Jakubiec J., 1964 – Witwazanie form haploidalnyc *Solanum tuberosum* L. Hodow. Rosl. Act. Nasian, 8.

Scanned with OKEN Scanner

CERCET. GENET. VEGET. ANIM., VOL. IV, 1996

ASPECTE DE EMBRIOLOGIE LA HIBRIDUL INTERSPECIFIC *SOLANUM DEMISSUM* × *SOLANUM TUBEROSUM* L. (II)

LUCREȚIA POP *, NATALIA R. MITROI **

Cercetările embriologice privind structura ovulului la *S. tuberosum* şi la alte specii ale genului *Solanum* au stabilit câteva caracteristici importante. Prima şi cea mai uşor de recunoscut a fost fuzionarea celor doi nuclei polari pentru a forma nucleul secundar al sacului embrionar (Young, 1923). Ulterior s-a arătat că formarea nucleului secundar şi polarizarea citoplasmatică a oosferei şi a celor două sinergide constituie un indicator al maturităţii ovulului (Ress-Leonard, 1935, Lamm, 1938; Clarke, 1940; Maheshwari, 1950; Dnyansagar şi Cooper, 1960; Stelly şi Peloquin, 1985; Randal, 1987).

În ceea ce priveşte dezvoltarea seminţei la plantele provenite din încrucişările interspecifice există mai multe ipoteze care explică cazurile de incompatibilitate la încrucişare. Dacă în timpul gametogenezei apar perturbări în nucleu, sacul embrionar poate conţine nuclei cu nivele diferite de ploidie.

În cazul când aceste perturbări apar după gametogeneză, sacul embrionar este haploid. Astfel de perturbări pot afecta însă şi endospermul caz în care acesta poate fi diploid, triploid, tetraploid, respectiv pentaploid sau hexaploid.

Diferenţele genomice cantitative sau calitative menţionaţi mai sus ale sacului embrionar după polenizare pot explica deosebirile în rata creşterii şi dezvoltării ovulelor embrionilor şi endospermelor după polenizare, respectiv autopolenizare (Watkins, 1932; Müntzing, 1933; Howard, 1939, 1942; Cooper şi Brink, 1940; Brink şi Cooper, 1947; Wangenheim, Peloquin şi Hougas, 1960; Rutishauser, 1969; Skiebe, 1973; Mitroiu, 1976; Nijs şi Peloquin, 1977).

La genul *Solanum* s-a putut dovedi o dezvoltare normală în toate experienţele cu endosperm hexaploid şi anomalii în endosperm tetraploid şi respectiv pentaploid.

* Institutul de Cercetare şi Producţie a Cartofului, Braşov
** Facultatea de Biologie, Bucureşti

Scanned with OKEN Scanner

În lucrarea de față se prezintă rezultatele cercetărilor privind modul de desfășurare a procesului de macrosporogeneză și embriogeneză a hibridului interspecific *Solanum demissum* × *S. tuberosum* cu rezistență la mană în vederea elucidării cauzelor fertilității reduse în prima generație de backcrossare. Hibrizii F_1 din astfel de încrucișări sunt pentaploizi (2n = 5x = 60), având pe lângă genomul propriu și genomul de *S. demissum* din care cauză prezintă o instabilitate citologică. Îmbunătățirea însușirilor de calitate, producție și fertilitate se realizează prin backcrosări repetate a hibrizilor F_1 cu soiuri de *S. tuberosum.* În general, în backcross 1, hibrizii sunt tetraploizi (2n = 4x = 48) prin eliminarea unui set de cromozomi (Gorea și Fodor, 1977).

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

Ca material biologic s-a folosit hibridul interspecific F_1 creat la Institutul de Cercetare și Producție a Cartofului de la Brașov, prin încrucișarea speciei hexaploide *Solanum demissum* × *S. tuberosum.* Acesta a fost backcrossat (retroîncrucișat) cu *S. tuberosum,* soiul Katiușa și Apta, folosite ca părinți recurenți pentru rezistența la mană și degenerare virotică. Rezultatele obținute cu soiul Katiușa au fost publicate în Buletinul Academiei de Științe Agicole nr. 22 din 1992, iar cele obținute în cazul folosirii soiului Apta fac obiectul lucrării de față.

S-au castrat un număr de 160 flori la hibridul F_1 și 100 flori la martor, în 3 stadii diferite de dezvoltare a florilor: prima zi, a doua zi și a treia zi după anteză.

Polenul s-a recoltat de la martor pe vreme însorită, apoi s-a determinat viabilitatea acestuia prin colorare cu lactophenol acid fuchsin (Sass, 1964). Polenizarea s-a efectuat a doua zi după castrare la ora 8,00. Pe parcursul primelor 76 ore, florile polenizate au fost recoltate la intervale de 4 ore, apoi la 4, 5, 6, 7, 10, 12, 15 și 20 zile de la polenizare. Probele s-au fixat în amestec de alcool: acid acetic (3:1) timp de 24 ore, după care au fost trecute în alcool 70% unde au fost păstrate până la împarafinarea lor, folosind alcool și xylol (alcool 15%, 35%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100%, xylol și parafină).

Secționarea blocurilor de parafină (p.t. 58°–60°C) s-a efectuat la 8–12 microni grosime. Secțiunile au fost colorate cu hematoxilină Ehrlich și montate în balsam de Canada.

S-au studiat și fotografiat câte 40 de ovule polenizate de la fiecare din cele trei stadii de dezvoltare a florilor.

Nivelul de ploidie din endosperm și embrion s-a determinat prin măsurarea diametrului a 25 nuclei (la endospermul hibrid și martor) și a numărării cromozomilor în diviziunea mitotică. La embrionul hibrid s-au analizat 60 celule în diviziune din preparatele embriologice și 20 de plantule obținute în seră din sămânță hibridă. Pentru colorare s-a folosit carmin acetic 2%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Plantele soiului martor au prezentat un polen normal dezvoltat, cu 67% viabilitate *in vitro* (fig. 1).

Scanned with OKEN Scanner

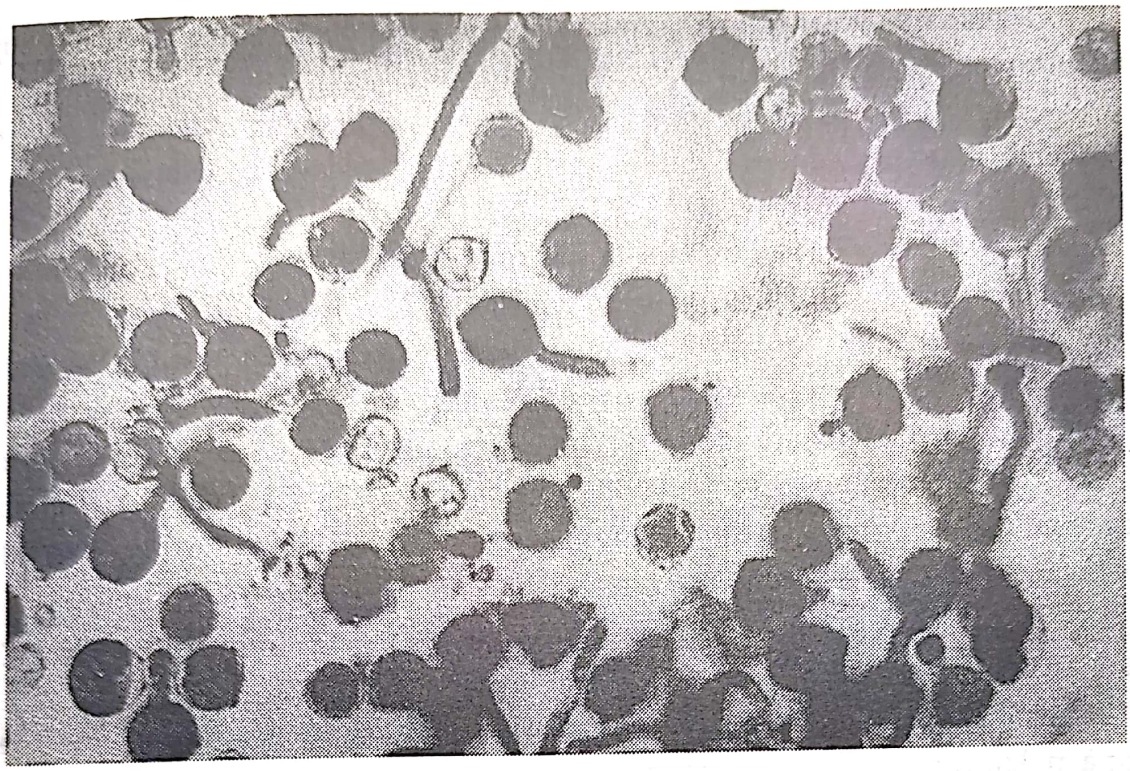


Fig. 1 – Germinarea polenului *in vitro* – martor (*In vitro* pollen germination – control)

Fig. 2 – Aparatul oosferei: sinergide (S), oosferă (O) şi nucleu secundar (n.s.) în ovulul matur (Oosphere, apparatus: synergids (S), Oosphere (O) and secondary nucleus (s.n.) in the adult ovule)

Scanned with OKEN Scanner

Germinarea polenului pe stigmatul florilor a fost observată la 30–32 ore după polenizare.

Începând din prima zi după anteză, la martor 30% din ovule au prezentat sacul embrionar în stadiu de 7 nuclei, acest procent crescând la 55 după două zile și la 70 după trei zile de la anteză (fig. 2).

Fecundarea a fost observată la un interval de 38–48 ore după polenizare, semnalându-se tuburi polinice în sacul embrionar la majoritatea ovulelor (fig. 3).

În gineceele florilor hibridului interspecific polenizate cu polen de la martor s-a constatat o neconcordanță în privința stadiilor de dezvoltare față de cele ale plantelor martor. Astfel, în prima zi după anteză, la hibrid, 18% din ovule au fost mature, în timp ce martorul a avut 30%. În a doua zi, 32% din ovule au fost mature și numai 55% în a treia zi, după anteză, comparativ cu martorul care a avut 70% ovule mature.

Stadiul de contopire a celor doi nuclei polari a fost des întâlnit la martor și mai puțin la hibrid (fig. 4).

Timpul optim de fecundare a avut loc la un interval cuprins între 46–76 ore după polenizare, când s-au observat și numeroase anomalii în sacul embrionar (oosfere și nuclei secundari nefecundați, zigoți degenerați și avortați, degenerarea endospermului și a embrionului, formarea de cordoane plasmatice etc. (fig. 5, 6, 7).

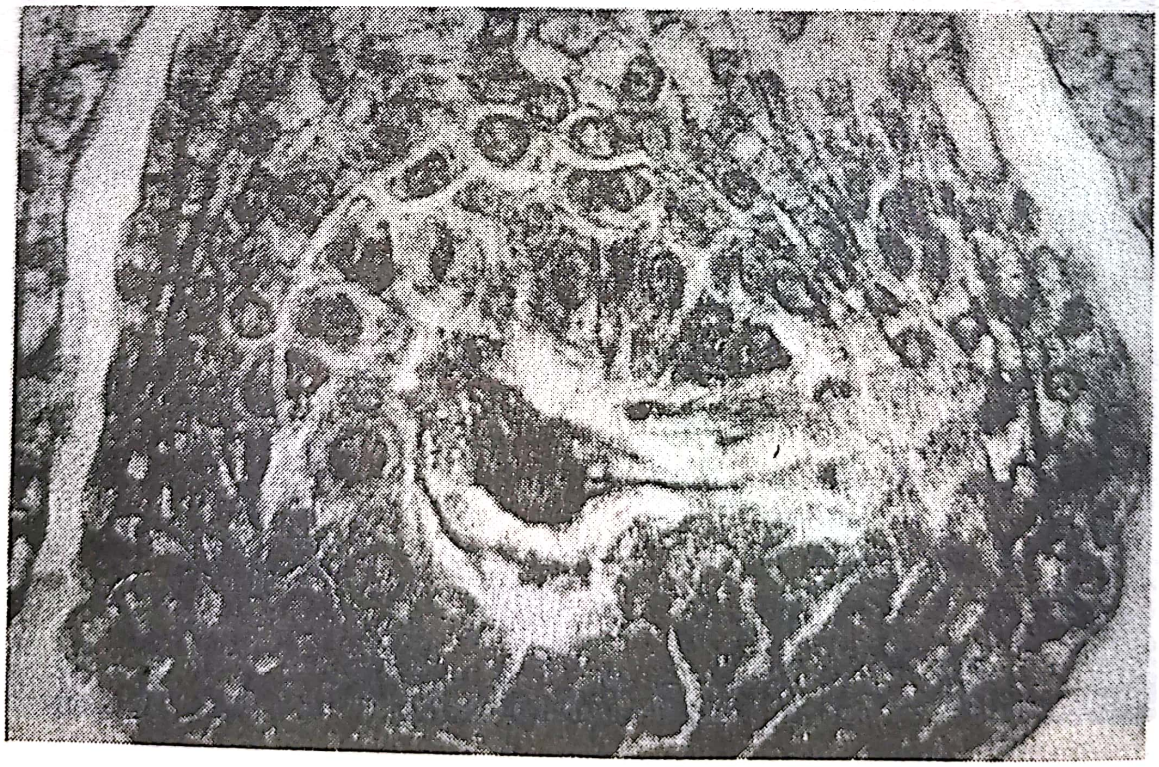


Fig. 3 – Tub polinic în sacul embrionar (Pollinic tube in the embryo sac)

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 4 – Nuclei polari nefuzionați; hibrid (Polar nonfusioned nucle; hybrid)

Fig. 5 – Degenerarea nucleului secundar al sacului embrionar (Degeneration of the secondary nucleus in embryo sac)

Scanned with OKEN Scanner

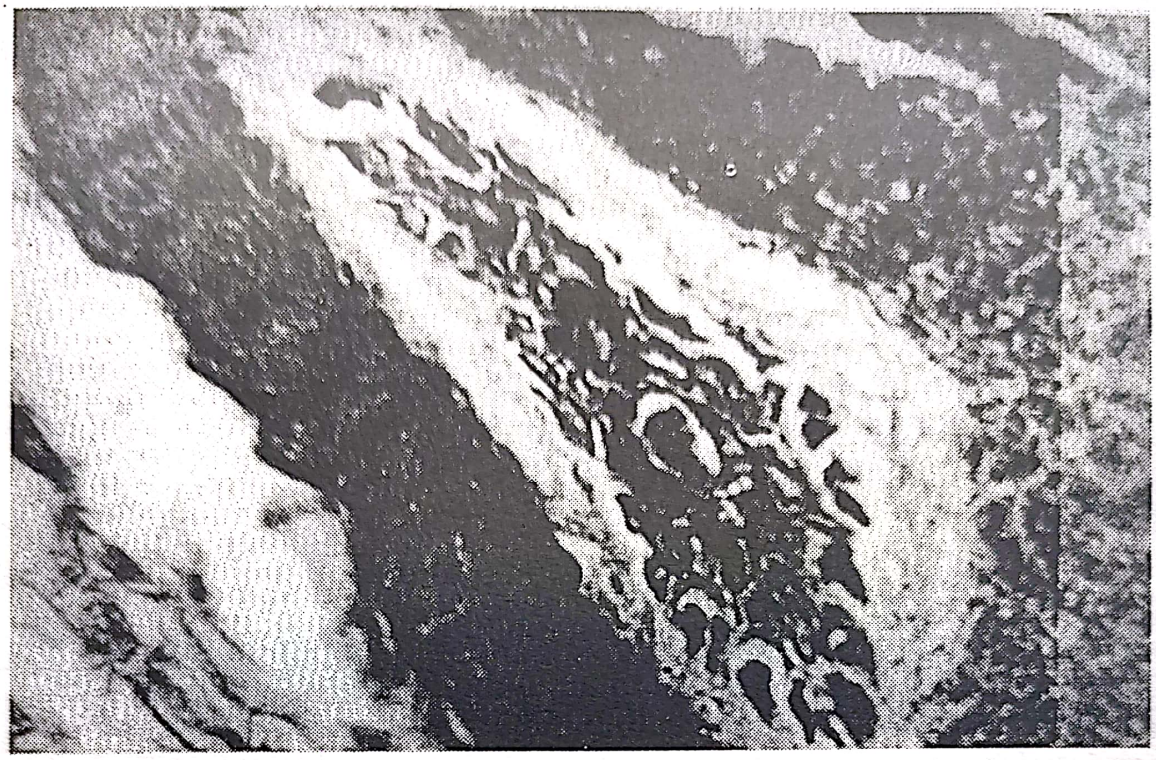


Fig. 6 – Degenerarea embrionului și endospermului hibrid (Degeneration of the hybrid embryo and endosperm)

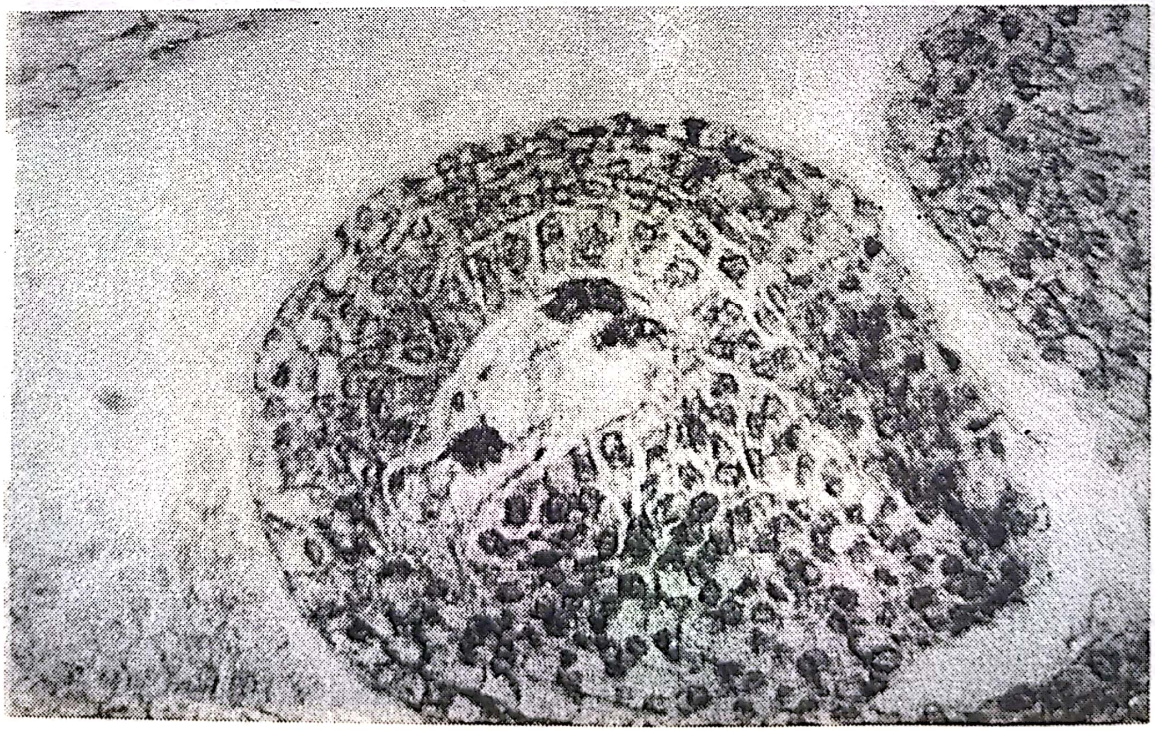


Fig. 7 – Nuclei polari în degenerare; hibrid (Polar degenerating nuclei)

Scanned with OKEN Scanner

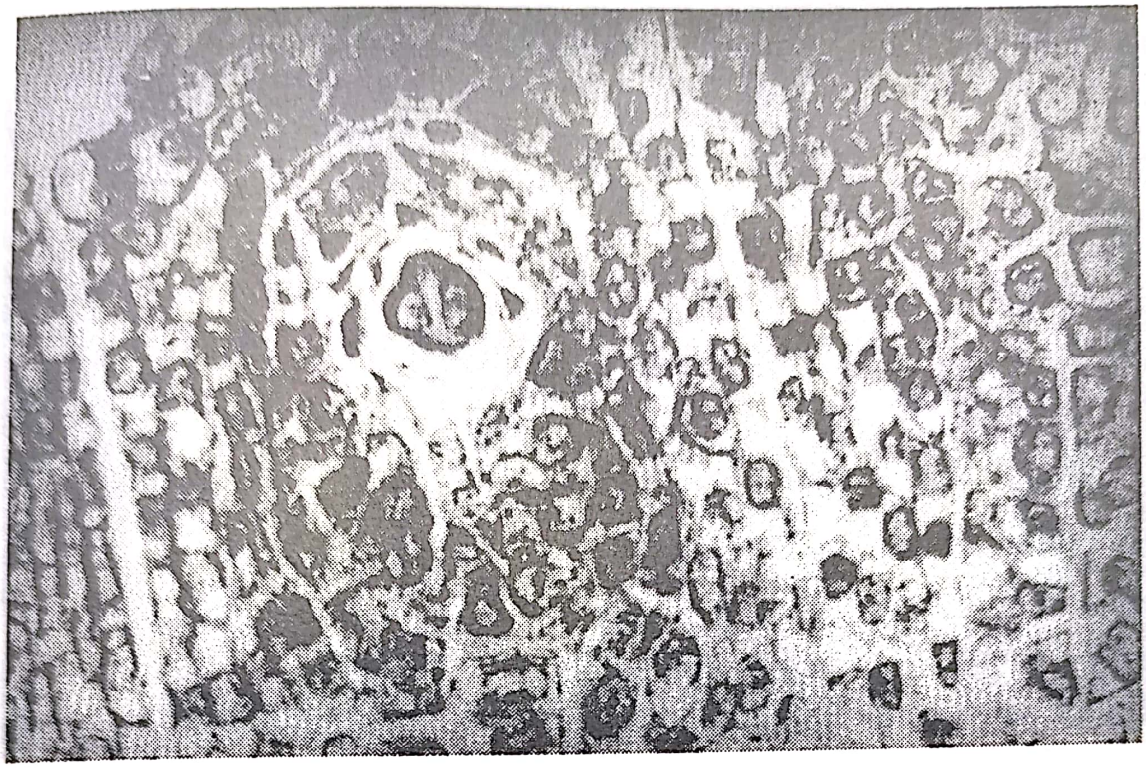


Fig. 8 – Prima diviziune a zigotului accesoriu; hibrid (First division of secondary zygote; hybrid)

Dezvoltarea embrionului și endospermului la plantele hibride a prezentat o largă variație în desfășurarea fazelor de dezvoltare. Astfel, prima diviziune a zigotului accesoriu a fost observată în mod frecvent la cinci zile, în timp ce la martor a avut loc la patru zile.

În ovulele anormale ale hibridului nucleul zigotului accesoriu a fost mult mai mic față de martor (fig. 8, 9). Nu este exclus ca în astfel de situații să nu fi avut loc tripla fuziune a nucleilor.

Celulele endospermului la plantele hibride au fost sărace în plasmă cu vacuole mari și fără nuclei sau cu nuclei puțini, mult diferite față de martor (fig. 10, 11, 12).

În dezvoltarea embrionului au fost observate diferențe la plantele hibride față de plantele martor, la aceleași stadii de dezvoltare a florilor. Astfel, în timp ce în unele ovule embrionii erau în faza de 2–4 celule sau octant, la martor, embrionul se afla într-o fază mult mai avansată.

Au existat totuși și unele ovule la hibrid cu endosperm și embrion normal (fig. 13).

Diferențele observate pe parcursul dezvoltării embrionului s-au menținut și în faza de embrion matur (fig. 14, 15). Aceste diferențe de mărime observate în preparatele microscopice corespund ratei de creștere în fazele timpurii de dezvoltare a plantelor.

Scanned with OKEN Scanner

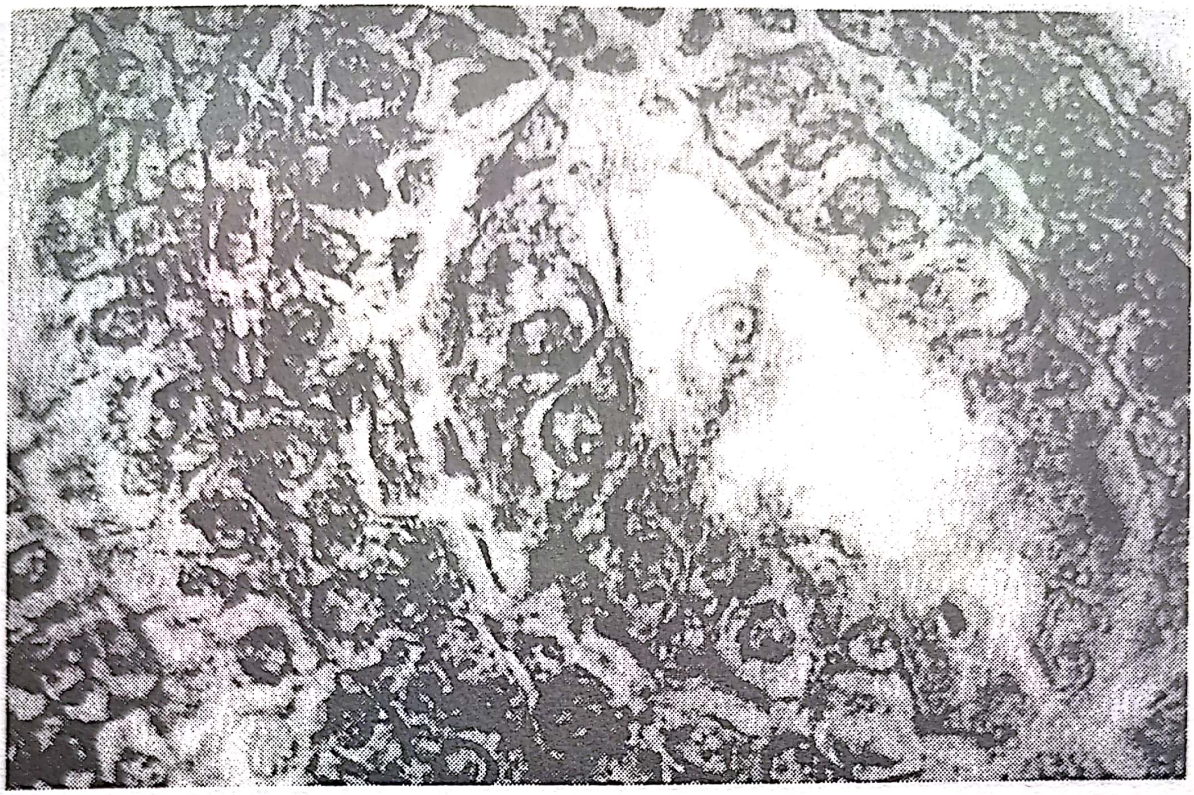


Fig. 9 – Prima diviziune a zigotului accesoriu; martor (First division of secondary zygote; control)

Fig. 10 – Dezvoltarea endospermului celular;hibrid
(Development of the cellular endosperm; hybrid)

Scanned with OKEN Scanner

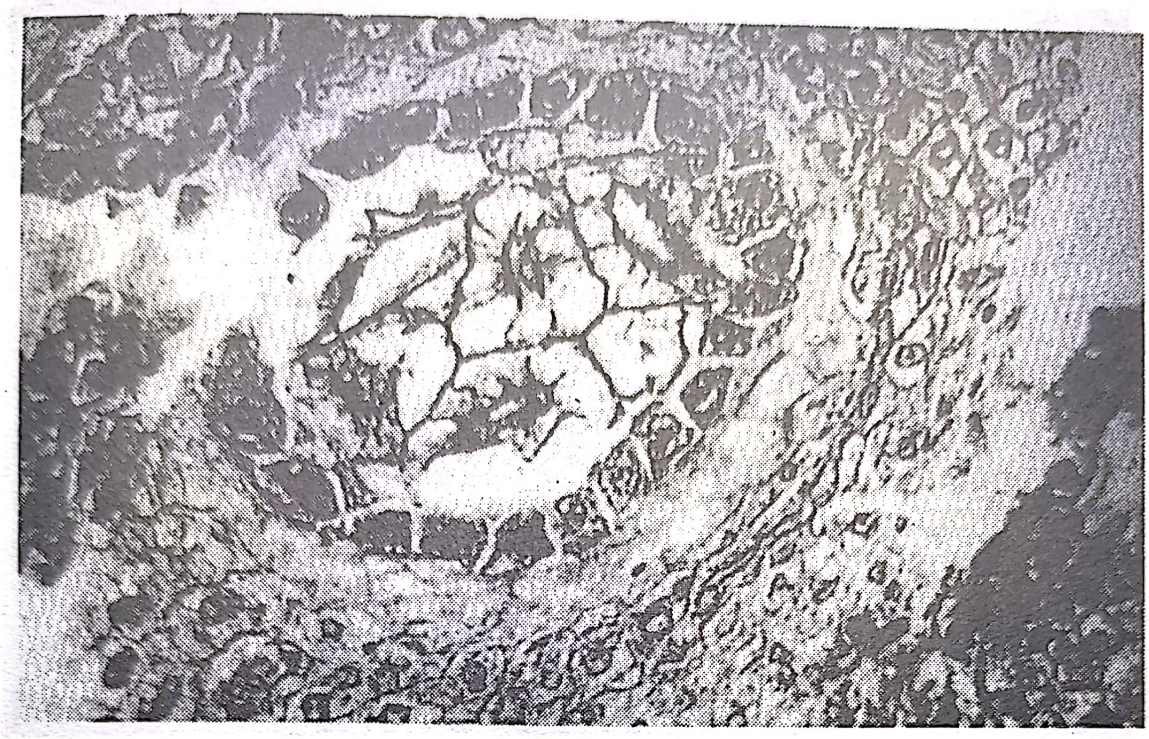


Fig. 11 – Dezvoltarea endospermului celular; hibrid
(Development of the cellular endosperm; hybrid)

Fig. 12 – Dezvoltarea endospermului celular; martor
(Development of the cellular endosperm; control)

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 13 – Preembrion într-un endosperm normal; hibrid
(Pro-embryo in normal endosperm; hybrid)

Fig. 14 – Embrion matur; martor (Adult embryo; control)

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 15 – Embrion matur; hibrid (Adult embryo; hybrid)

Aprecierea gradului de ploidie al endospermului s-a făcut pe baza mediei diametrului nucleilor (tabelul 1).

Tabelul 1

Media diametrului nucleilor endospermului la câteva ovule după polenizare şi autopolenizare/um
(Diameters mean of endosperm nuclei in some ovules after pollination and selfpollination/um)

Soi, hibrid (Cultivar)	Nr. nuclei studiaţi (No of studied nuclei)	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	
		Ovule normale (Normal ovules)	Ovule anormale (Abnormal ovules)
Apta	25	12,02 ± 2,92	
(*S. demissum* × *S.tuberosum*) × × *S. tuberosum*	25	11,9 ± 1,79	6,95 ± 1,46

Nu sunt diferenţe importante între media diametrului nucleilor din ovulele normale ale hibridului şi martor. Aceasta poate indica faptul că ambele grupe ale nucleilor au acelaşi nivel de ploidie, deci hexaploide.

Au existat totuşi în unele ovule ale hibridului şi nuclei de dimensiuni foarte mari. Variaţia diametrului nuclear din endosperm poate fi cauzată de diviziunea nucleară amitotică (Mackiewicz 1973). Diametrul nucleilor endospermului din ovulele anormale ale hibridului a fost mult mai mic faţă de nucleii din ovulele normale. Aceasta se poate datora nivelului scăzut de ploidie existent în celule. Analiza a 30 de celule în diviziune mitotică din endosperm a confirmat acest lucru.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 16 – Perturbări în diviziunea endospermului; hibrid
(Disturbance in endosperm division; hybrid)

Fig. 17 – Cromozomi în celulele somatice 2n = 4x = 48 (hibrid)
(Chromosomes in somatic cells 2n = 4x = 48) (hybrid)

Scanned with OKEN Scanner

Alături de celule hexaploide s-au găsit celule diploide şi tetraploide. În restul celulelor au fost fragmente de cromozomi (fig. 16).

Datorită dezvoltării lente a endospermului din hibrid a fost dificil de stabilit numărul de cromozomi la mai multe celule.

La embrionul hibrid, din cele 60 de celule analizate, 48 celule au avut 48 cromozomi, 12 celule au prezentat numeroase fragmentări de cromozomi şi celule cu micronuclei. Perturbările în diviziunea mitotică a embrionului au fost mai frecvente în faza de proembrion (2–8 celule) şi mai puţin în fazele mai avansate de dezvoltare.

Cele 20 de plantule din seră analizate citologic au avut în celulele somatice 2n = 48 cromozomi, ceea ce pledează pentru admiterea eliminării unui set de 12 cromozomi din lipsa de homologie (fig. 17).

CONCLUZII

▼ Hibridul interspecific în prima generaţie de backcrossare a prezentat anomalii în rata de creştere şi dezvoltare a endospermului şi a embrionului în comparaţie cu martorul Apta.

▼ Anomaliile observate în preparatele microscopice ar putea fi o cauză a căderii florilor polenizate în câmp.

▼ Slaba dezvoltare a endospermului la plantele hibride ar explica, cel puţin parţial cauza neformării seminţelor şi avortarea florilor.

▼ Dezvoltarea unei seminţe normale are loc numai într-un endosperm bogat în citoplasmă, cu mulţi nuclei şi fără perturbări în diviziunea nucleară.

EMBRYOLOGIE ASPECTS OF INTERSPECIFIC HYBRIDS *SOLANUM DEMISSUM* × *S. TUBEROSUM* L. (II)

SUMMARY

From the interspecific crosses between hexaploid species *S. demissum* × *S. tuberosum* is very difficult to obtain late blight resistent genetic material. The quantity of seed is rather small in the first generation of backcross.

In the pollinated ovules of the hybrid both endosperm and embryo are developed. The embryo and endosperm growth rate was lower by comparison with the control variety Apta. In the embryo cells were seen a difference in nuclei diameters and disturbances of mitotic division. That means that treble fusion of nuclei did not take place.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Brink R. A., Cooper D. C., 1947 - The endosperm in seed development Bot. Rev. 13, 8/9.
Clarke A.,E., 1940 – Fertilization and early development in the potato. Am. Pot. Journal, 17: 20–25.
Cooper D. C., Brink R. A., 1940 – Somatoplastic sterility as a cause of seed falure, after interspecific hybridization. Genetics 25: 592–615.
Dnyansagar V. R., Cooper D. C., 1960 – Development of the seed of Solanum phureja. Am. J. Bot. 47: 176–186.
Gorea T., Fodor I., 1977 – Aspecte genetice ale ameliorării rezistenței cartofului la mană. Probl. genet. teor. aplic. IX, 3: 225–266.
Howard H. W., 1939 – The size of seeds in diploid and autotetraploid Brassica L. I. Genet. 38: 352–340.
Howard H. W., 1942. – The effect of polyploidy and hibridity on seed size in crosses between *Brassica chinensis, B. carinata,* amphidiploid *B. chinensis – carinata* and autotetraploid *B. chinensis.* J. Genet. 43: 105–119.
Lamm, 1938 – Notes on a haploid potato hybrid. Hereditas 24: 391–396.
Mackiewicz T., 1973 – Fertilization, endosperm and embryo development in *Brassica oleracea* var. *capitata* L. × *B. oleracea* var. *acephala* DC hybrid as compared with the parental forms. Genet. Polonica 14: 11–19.
Maheshwari. P., 1950 – An introduction to the embryology of Angiosperms. McGraw-Hill Book Company I.V.C. New York, London.
Mitroiu R. N., 1976 – Embriologie vegetală. București.
Müntzing A., 1933 – Hybrid incompatibility and the origin of polyploidy. Hereditas 18: 33–55.
Nijs A.P.M., Peloquin S. J., 1977 – The role of the endosperm in hybridization. Am. Potato J. 54: 488–489.
Randall O., 1987 – Ovule maturity in relation to blossom age of a diploid clone of *Solanum tuberosum.* J. Canad. of. Bot, 65: 706–709.
Rees-Leonard O. L., 1935 – Macrosporogenesis and development of the macrogametophyte of *Solanum tuberosum.* Botanical Gazette 96: 734–750.
Rutishauser A., 1969 – Embriologie und Fostpflanzumgsbiologie der Angiospermen. Springer – Verlag, Wien – New York, 1969.
Sass J. E., 1964 – Botanical Microtechnique Yowa State University Press. Ames. Yowa, 228.
Skiebe K., 1973 – Genetische Voranssetzungen für die Samenbildung nach intergenomatisch verschiedenen Kreuzungen. Arch. Züchtungsforsch. 3: 183–202.
Stelly D. M., Peloquin S. J., 1985 – Screening for 2n female gametophytes, female fertility and 2x × 2x. crossability in potatoes (Solanum spp).Am. Pot. Journal: 519–529.
Wangenheim K. H. (von), Peloquin S. J., Hougas R. W., 1960 – Embryological investigations on the formation of haploid in the potato. Zeitschr. Vererbungsleehre 91/ 391–399.
Watkins A. E., 1932 – Hybrid sterility and incompatibility. J. Genet. 25: 125–162.
Young W. J., 1923 – The formation and degeneration of germ cells in the potato.: Am. J. Bot. 10:325–335.

Scanned with OKEN Scanner

INFLUENȚA CONDIȚIILOR *IN VITRO* ASUPRA COMPORTAMENTULUI CITOGENETIC AL UNOR GENOTIPURI DE SFECLĂ FURAJERĂ

DORICA BOTĂU, G. NEDELEA, AL. MOISUC *

Condițiile de cultivare *in vitro,* mai ales balanța hormonală a mediilor de cultură, influențează evoluția citogenetică a țesuturilor vegetale și în strânsă legătură cu aceasta, capacitatea lor de regenerare.

Cercetări citogenetice asupra calusului au fost întreprinse la sfecla de zahăr, orz, tutun, subliniindu-se că variabilitatea cromozomală în condițiile cultivării *in vitro* reprezintă un factor care inhibă capacitatea de regenerare a plantelor (Crevecoeur și colab., 1992; Kallak, 1968; Kallak și Iarvekylg, 1977; Scheunert și colab., 1978).

În cercetările noastre s-a urmărit comportamentul citogenetic al celulelor calusului și al celulelor plantelor regenerate în comparație cu celulele plantelor normale, în scopul stabilirii unei corelații între caracteristicile cariologice ale celulelor și comportamentul lor fiziologic în ce privește diferențierea celulară și regenerarea plantelor.

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

Cercetările noastre s-au efectuat asupra unor genotipuri de sfeclă furajeră, care au prezentat o capacitate bună de regenerare și care au format calus: Armonogal, Ursus – soiuri diploide și Tetra Rosu, Tetra 181 – soiuri tetraploide.

Regenerarea plantelor de sfeclă furajeră s-a realizat pe mediu Murashige-Skoog cu 1 mg/l acid naftalenacetic și 0,1 mg/l benzilaminopurina, din meristem special al plantelor obținute prin germinarea semințelor. Calusul a fost obținut prin cultivarea țesutului foliar și a ovarelor fecundate pe același mediu, conținând 2 mg/l acid diclorfenoxiacetic. Transferat pe mediu de regenerare (MS + 1 mg/l ANA și 0,1 mg/l BAP), calusul nu prezintă capacitate regenerativă.

* Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului

Scanned with OKEN Scanner

Studiile citogenetice s-au realizat pe preparate squash, colorate după metoda Feulgen, din calus aparţinând speciilor amintite.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

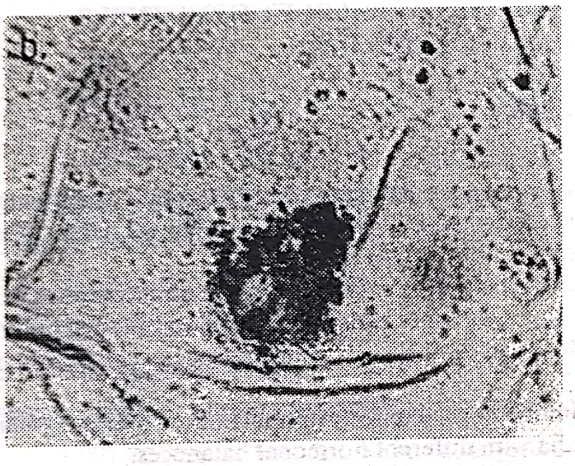
În ţesutul meristematic radicular al plantelor regenerate din apexul vegetativ nu s-au observat modificări citogenetice. Celulele meristematice au prezentat nuclei normali, fără modificări morfologice, la fel ca în cazul plantelor normale. Nu s-a observat modificarea stării de ploidie: plantele diploide şi-au păstrat acest caracter, la fel şi cele tetraploide. De asemenea, nu s-au semnalat modificări în desfăşurarea procesului mitotic, înregistrând etapele diviziunii cu fenomenele caracteristice. Lipsa modificărilor în morfologia nucleilor şi în evenimentele diviziunii mitotice la plantele regenerate *in vitro* evidenţiază o bună stabilitate genetică a celulelor din meristemul apical al plantelor în condiţiile cultivării pe mediu artificial. Celulele plantelor regenerate prezintă aceleaşi caracteristici genetice cu ale plantelor normale (Vostrakova şi colab., 1983).

Studiul citogenetic al celulelor calusale a relevat o diversitate a mărimii şi formei nucleilor. S-au evidenţiat, de asemenea, nuclei polimorfi, unii de dimensiuni mari (fusiformi, lobaţi), nuclei vacuolaţi, nuclei cu număr variabil de cromocentri (fig. 1 a, b, c). Din examinarea celulelor de calus aflate în diviziune mitotică s-au constatat unele deviaţii ale procesului. La soiurile tetraploide s-au evidenţiat celule binucleate, cariochineza nefiind urmată de citochineză (fig. 2). La soiurile diploide s-au observat celule cu nuclei mici (fig. 3).

Revenirea la starea de totipotenţă a celulelor diferenţiate, sub influenţa unor fitohormoni, în procesul calusogenezei, poate fi cauza unei mari variabilităţi a materialului genetic. În celulele calusale au loc amitoze sau fragmentări ale nucleului fără a fi urmate de diviziunea citoplasmei, ceea ce duce la apariţia celulelor binucleate. Celulele cu nuclei foarte mici sau foarte mari rezultă în urma unor mitoze de tip C, sau a unor fenomene aneuploide. Prin replicarea ADN-ului limitată la anumite secvenţe heterocromatinice, se formează celule ale căror nuclei prezintă un număr mare de cromocentri. Nucleii cu dimensiuni mari pot fi rezultatul unor endomitoze (Crevecoeur şi colab., 1992; Kallak. 1968).

Frecvenţa mare a modificărilor procesului mitotic la nivelul celulelor calusului poate fi explicată prin condiţiile de cultură şi în special acţiunea regulatorilor hormonali asupra comportamentului genetic celular. Unii autori consideră că fitohormonii acţionează în acest caz ca agenţi mutageni, determinând apariţia unui calus heterogen din punct de vedere citogenetic. Pe lângă această acţiune a regulatorilor de creştere intervine şi activitatea metabolică a ţesutului supus condiţiilor *in vitro* (Kallak şi Yarvekylh, 1977; Scheunert şi colab., 1978).

Scanned with OKEN Scanner



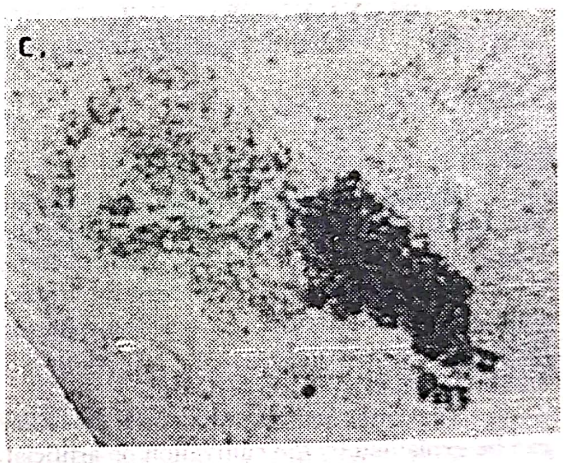


Fig. 1 – Celulele calusale cu nuclei polimorfi (Callus cells with polymorphous nuclei): a) nucleu lobat (polymorphous nucleus); b) nucleu vacuolat (vacuolated nucleus); c) nucleu cu mulţi cromocentri (enlarged chromocentres)

Fig. 2 – Celulă calusală binucleată (Binucleated callus cell)

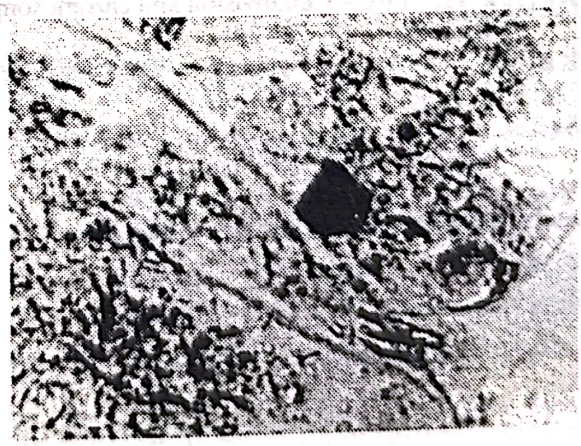


Fig. 3 – Celulă calusală cu nucleu foarte mic (Callus cell with very small nucleus)

Scanned with OKEN Scanner

CONCLUZII

▼ Celulele meristemului apical al plantelor de sfeclă furajeră sunt mai stabile genetic şi metabolic, asigurând o bună regenerare a plantelor la această specie.

▼ Calusul, datorită unei mari heterogenităţi citogenetice generate de condiţiile cultivării *in vitro*, nu prezintă capacitatea regenerativă.

▼ Prin stabilirea anumitor condiţii de cultură se poate menţine şi multiplica un calus cu heterogenitate genetică sporită în scopul izolării unor linii celulare cu anumite caracteristici.

THE INFLUENCE OF *IN VITRO* CONDITIONS ON CYTOGENETIC BEHAVIOUR OF SOME FODDER BEET GENOTYPES (*BETA VULGARIS* L. SSP. CRASSA D.B.)

SUMMARY

Cytogenetic behaviour of callus cell and *in vitro* regenerated plant cells from apical meristems of four fodder beet genotypes with a good regeneration capacity has been tested (Armonogal, Ursus, Tetra Rosu, Tetra 181). This study was made in comparison to normal plants.

The regenerated plants showed a good phenotype and numerical stability of chromosomes as well as stability of mitosis stages. The callus of studied genotypes showed a considerable variability of the nucleus morphology (polymorphous nuclei, differences in nuclear size and enlarged chromocentres) and the number of chromosomes.

The callus have shown several deviation from the normal mitosis (amplification, amitosis) which can be explained by the cultivation on artificial media with different hormonal balaneces.

BIBLIOGRAFIE

Crevecoeur M., Hagege D., Catesson A. M., Greppin H., Gaspar T., 1992 – Ultrastructural characteristics of cells from normal an habituated sugar beet calli. Plant. Phisiol. Biochem., 30, 1: 87–95.

Kallak H., 1968 – Cell division and chromosome numbers in the tissue culture of *Nicotiana tabacum*. Bio. Plant., 10: 197–244.

Kallak H., Yarvekylg L., 1977 – Nuclear behaviour in callus cells: morphology and division . Biol. Plant., 19, 1: 48–52.

Scheunert R. U., Zlata B., Shamina H., 1978 – Karyological features of barley callus tissue cultur *in vitro*, Biol. Plant., 20, 5: 305–308.

Vostrakova-Nemkova B., Rakousky S., Ondrey M., 1983 – Chromosomal characteristics of barley root meristems differentiated from calli. Biol. Plant., 25: 288–292.

Scanned with OKEN Scanner

STUDIUL GENETIC AL CONȚINUTULUI DE ALCALOIZI LA LUPINUL ALB (*LUPINUS ALBUS* L.)

MINODORA MEDI FRITEA *

Lupinurile, ca și alte leguminoase pentru boabe, au o valoare nutritivă apreciabilă dată de conținutul mare în proteine (Anisziewski, 1993), fiind utilizate mai ales în hrana oamenilor și a animalelor (Hill, 1977).

După anul 1920, când Von Sengbusch, ca urmare a unei laborioase activități de selecție, reușește să izoleze primele genotipuri „libere" de alcaloizi (dulci) la speciile *Lupinus angustifolius, Lupinus luteus* și *Lupinus albus,* interesul pentru ameliorarea și folosirea lupinului a urmat un curs ascendent.

Utilizarea unei metode eficiente în procesul de ameliorare a calității lupinurilor, ca și în cazul altor plante, presupune cunoașterea și aprofundarea unor aspecte legate de genetica, fiziologia și chimia alcaloizilor chinolizidinici (tabelul 1) prezenți în plante și în semințe.

Spre deosebire de alte specii de lupin, cum ar fi *Lupinus mutabilis,* conținutul scăzut de alcaloizi la speciile mediteraneene nu se află sub control poligenic (Von Baer și Gross, 1971); numărul haploid de cromozomi la specia *Lupinus albus* (n = 25, n = 24 – Hackbarth și Troll, 1959; Hill, 1977) mai mare decât numărul de bază al majorității speciilor vegetale superioare (x = 6,...10) ar putea fi atribuit totuși stării poligenice (Hackbarth și Troll, 1959), cu o serioasă contribuție la determinismul poligenic al conținutului de alcaloizi la aceste specii (Pate și colab.,1977).

Sistemul poligenic nu exclude prezența unor relații genetice de natură alelică și nealelică, ori influența background-ului (Turbin și Anohina, 1973), prin urmare cvasiabsența alcaloizilor la specia *Lupinus albus* ar putea fi consecința mai multor sisteme genetice (Berthaut și Sixdenier, 1977; Fritea și Sarca, 1993).

Conținutul scăzut de alcaloizi în semințe este condiționat de acțiunea genelor recesive (Sengbush, 1942) sau parțial recesive care pot bloca sinteza alcaloizilor în țesuturile verzi (Williams și colab., 1984).

* Stațiunea de Cercetări Agricole, Livada

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Compoziţia şi cantitatea alcaloizilor chinolizidinici din seminţele de lupin la diferite ecotipuri
(The composition and quinolizidine alkaloids content in lupine seeds of different ecotypes)

(după Wink, 1990)

Alcaloizi (Alkaloids)	% din total (% from total)			
	L. albus	*L.angustifolius*	*L. mutabilis*	*L. luteus*
Sparteină	+	+	5–20	30–50
Lupanină	50–80	50–80	50–70	+
17-Oxolupanină	+	+	–	–
4-Hydroxilupanină	–	–	7	–
13-Hydroxilupanină	5–15	10–20	10–20	–
Albină	5–15	–	–	–
Multiflorină	3–10	–	+	–
Angustifolină	+	5–20	+	–
Tetrahydrorhombifolină	+	+	4	+
Lupinină	–	–	–	40–50
Esteri	1–5	1–3	1–5	+

+ = urme (tracks)

Stabilitatea conţinutului de alcaloizi din seminţe este determinată de factorul genetic, nivelul ridicat al acestor compuşi azotaţi fiind expresia sistemului de autoapărare al plantei (Hagima şi colab., 1994), deoarece sparteina, lupanina şi 13-hydroxilupanina determină efecte antivirale, antibacteriene şi antifungice (Wink, 1990).

Prezentul studiu reprezintă o tentativă experimentală menită să surprindă anumite aspecte genetice privind procesul de sinteză şi translocare a alcaloizilor la lupinul alb, constituind doar rezultatele parţiale ale unui studiu amplu, ce cuprinde mai multe categorii şi cicluri de experienţe.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Cinci varietăţi de lupin alb au fost dirijate în sistem backcross în scopul studiului genetic al conţinutului de alcaloizi. Experienţele în câmp au fost efectuate în perioada 1990–1993 (primul ciclu) la S.C.A. Livada, materialul fiind semănat conform metodei blocurilor randomizate, în patru repetiţii (100 pl./variantă) (tabelul 2).

Analizele chimice privind conţinutul total de alcaloizi şi proteine în seminţele celor şase populaţii genetice (P_1, P_2, F_1, F_2, Bc_1, Bc_2) au fost efectuate prin metoda Deaggendorf (Wiewiorowski şi Skolik, 1959), respectiv prin metoda microkjeldahl.

Valorile procentuale ale alcaloizilor au fost transformate în unităţi unghiulare (arcsin $\sqrt{\%}$) şi au fost utilizate pentru estimarea:

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2

Caracterele fenotipice ale cultivarelor incluse în studiul genetic
(Phenotypical traits of cultivars included in genetical study)

Varietatea (Variety)	Țara de origine (Country)	MMB (Weight 1 000 grains)	Proteina brută, % din s.u. (Crude protein % from)	Alcaloizi total % din s.u. (Alkaloids total % from)	Perioada de vegetație, zile (Vegetation period, days)	Producția de semințe, kg/ha (Seed yield, kg/ha)
Bihor	Populația locală	320	36,5	0,570	145	3 800
Nyirsegi	Ungaria	330	39,4	0,050	140	2 500
Lublanc	Franța	300	41,18	0,030	130	2 200
Blanca	Franța	310	41,76	0,048	132	2 000
Hansa	Germania	300	41,37	0,038	135	1 900

- efectului acțiunii și a tipului de acțiune a genelor implicate în ereditatea conținutului de alcaloizi după modelul matematic propus de Hayman (1958) și utilizat de Gamble (1962);
- coeficientul de ereditate în sens larg (HL-Lush, 1945; Mahmud și Kramer, 1951) și în sens restrâns (HS-Warner, 1952 – citați de Dencescu, 1980);
- corelațiile genotipice și fenotipice dintre proteine și alcaloizi (Ceapoiu, 1968; Petr și Frey, 1966 citați de Dencescu, 1980).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Valorile medii și distribuția frecvențelor populațiilor F_1 și F_2 arată că nivelul mediu al alcaloizilor a fost intermediar valorilor parentale, ceea ce sugerează prezența factorilor de dominanță în exprimarea caracterului (tabelul 3, fig. 1, fig. 2). Valorile medii ale Bc_1 au fost intermediare ambilor părinți, ceea ce ar putea fi expresia existenței unor relații de dominanță – recesivitate între altele ce controlează procesul de biosinteză a alcaloizilor, a unor interacțiuni nealelice sau a unei serii alelice. Curba distribuției F_2 arată regăsirea în cadrul acestei populații a unor tipuri asemănătoare parentale.

Distribuția frecvențelor și valoarea medie a populației F_2 (în situația în care genitorul matern a fost un soi dulce) sunt intermediare valorilor formelor parentale. În plus, în cadrul populației F_2, se poate observa prezența unor segregante foarte importante pentru ameliorarea acestui caracter.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3

Valorile medii şi varianţa conţinutului de alcaloizi (%) ale populaţiilor parentale şi hibride rezultate din sistemul backross

(Average values and variance of alkaloids content (%) of parental and hybrid populations resulted in backross system)

Încrucişări (Crosses)	Populaţia genetică (Genetic populations)											
	P_1		P_2		F_1		F_2		BC_1		BC_2	
	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2
Bihor/Nyirsegi	4,33	0,02	1,28	0,004	3,93	0,106	2,28	0,1	0,07	4,25	3,29	0,079
Nyirsegi/Bihor	1,28	0,003	4,30	0,02	2,92	0,09	2,70	0,15	0,02	3,15	4,3	0,028
Bihor/Lublanc	4,20	0,014	0,99	0,002	3,26	0,047	2,18	0,08	0,07	3,89	2,92	0,016
Lublanc/Bihor	0,94	0,001	4,25	0,023	2,70	0,022	2,43	0,05	0,01	2,83	3,9	0,052
Bihor/Blanca	4,26	0,013	1,23	0,002	3,67	0,038	2,32	0,05	0,04	3,77	2,88	0,037
Bihor/Hansa	4,24	0,02	1,08	0,002	3,59	0,03	2,47	0,07	0,07	4,05	2,92	0,026

Tabelul 4

Efectul acţiunii genelor implicate în controlul biosintezei şi translocării alcaloizilor chinolizidinici

(The effect of genes activity involved in byosynthesis control and quinolizidine alkaloids translocation)

Încrucişări (Crosses)	Efectul genetic (Genetic effect)											
	m		a		d		aa		ad		dd	
	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2	$\bar{X}$	S^2
Bihor/Nyirsegi	2,28	0,1	0,96	0,15	7,08***	2,92	5,96***	2,21	–0,57	4,3	–7,57***	4,46
Nyirsegi/Bihor	2,70	0,15	–1,15*	0,05	4,23***	2,69	4,41***	2,59	0,36	0,06	–7,58***	3,55
Bihor/Lublanc	2,18	0,09	0,97*	0,08	5,56***	1,36	4,90***	1,91	–0,64	2,16	–6,81***	2,40
Lublanc/Bihor	2,43	0,05	–1,07*	0,06	3,82***	1,08	3,74***	1,05	0,56	0,85	–6,56***	2,01
Bihor/Blanca	2,32	0,05	0,86	0,07	5,14***	1,09	4,02***	1,08	–0,62	2,13	–4,49***	1,77
Bihor/Hansa	2,47	0,07	1,13	0,09	4,99***	1,45	4,06***	1,42	–0,45	2,65	–5,50***	2,03

t 5% = 1,982
t = distribuţie (după Snedecor, citat de Ceapoiu, 1968)

Studiul efectului acţiunii genelor implicate în ereditatea procesului de biosinteză şi translocare a alcaloizilor chinolizidinici (tabelul 4) evidenţiază o concentrare a genelor dominante la varietatea amară (Bihor), în special în cazul în care soiul amar are rol de genitor matern. Se observă, de asemenea, prezenţa interacţiunilor genice nealelice de tip epistatic (aa şi dd).

Scanned with OKEN Scanner

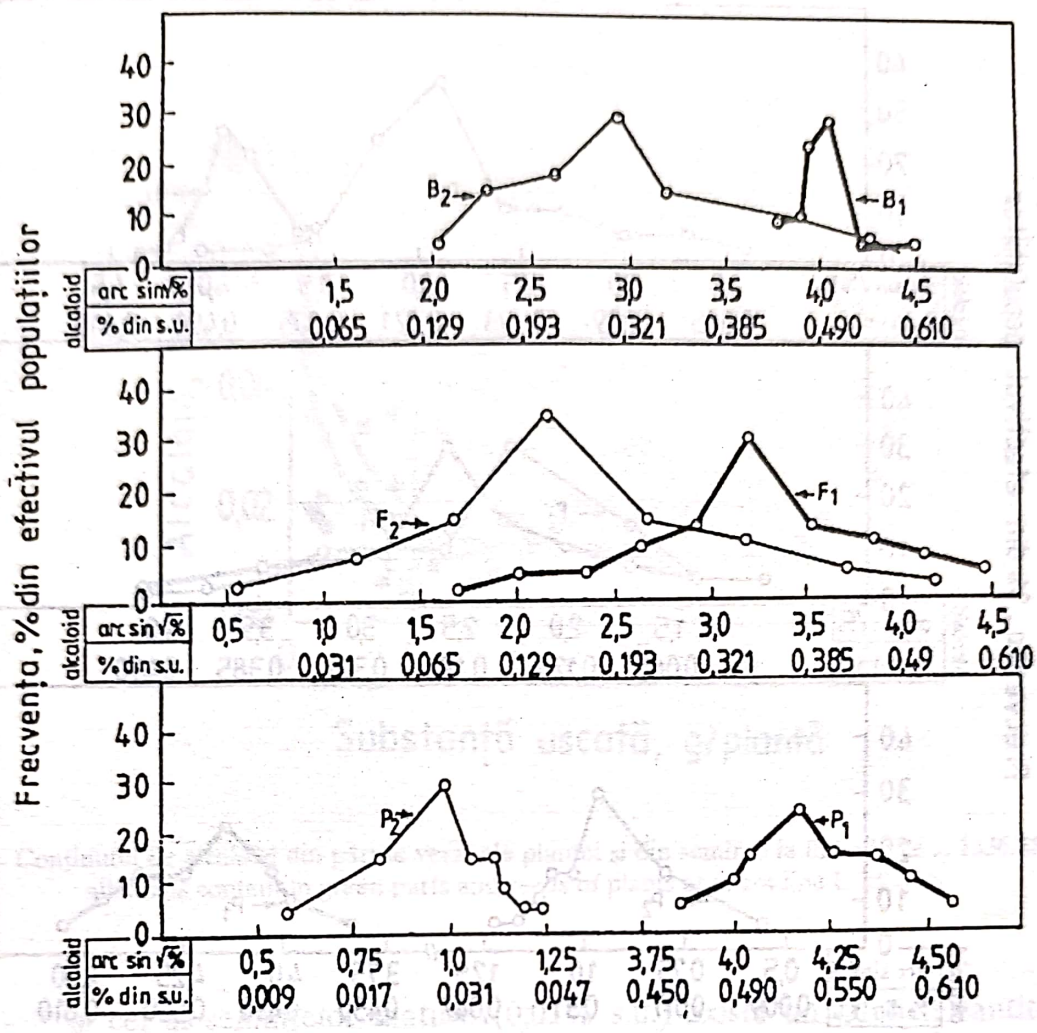


Fig. 1 – Distribuția frecvențelor conținutului de alcaloizi la populațiile genetice aparținând încrucișării Bihor/Lublanc (The distribution of frequences of alkaloids content in genetic populations belonging Bihor/Lublanc crossing)

Aceste aspecte genetice pot fi expresia existenței mai multor lanțuri metabolice, aflate sub control enzimatic, care declanșează sau blochează sinteza alcaloidului (Hartmann, 1988).

Declanșarea procesului de biosinteză a alcaloizilor are loc sub controlul genelor alele dominante, iar sistarea acestuia pare să fie rezultatul acțiunii genelor recesive sau parțial recesive, aflate în stare homozigotă, mai ales în situația în care genitorul matern este un soi dulce. În acest punct al determinismului interpretativ al rezultatelor experimentale intervine următoarea problemă: efectul interacțiunilor epistatice acționează în sensul sistării procesului de biosinteză sau în blocarea translocării alcaloizilor chinolizidinici din țesuturile verzi ale plantei la semințe?

Rezultatele studiului privind dinamica alcaloizilor în plante, în diferite faze de vegetație la cele două categorii de genotipuri (dulci și amare), efectuat la S.C.A.

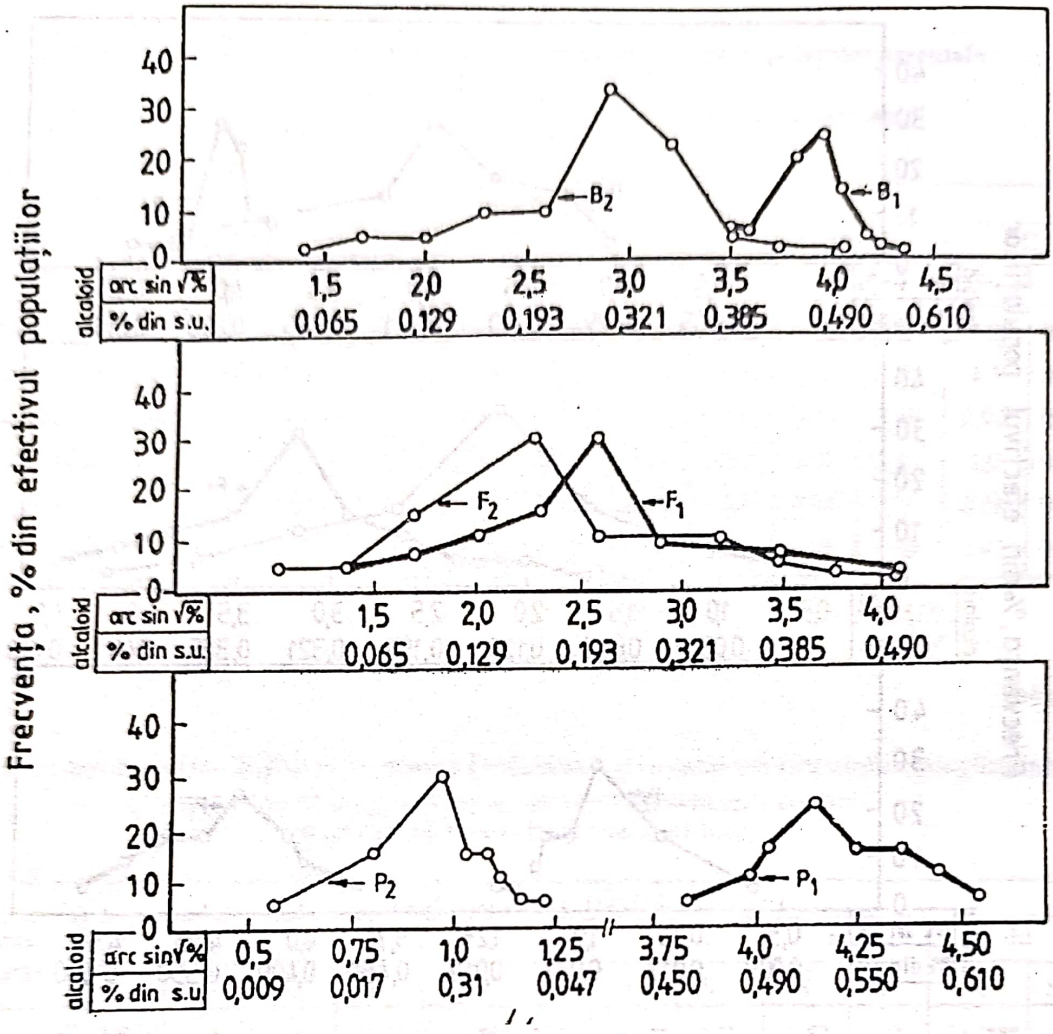


Fig. 2 – Distribuția frecvențelor conținutului de alcaloizi la populațiile genetice aparținând încrucișării Lublanc/Bihor (The distribution of frequences of alkaloids content in genetic populations belonging Lublanc/Bihor crossing)

Livada începând cu anul 1992, au fost coroborate cu opiniile lui Williams (1984) despre diferențele privind gradul de toxicitate al alcaloizilor translocați din țesuturile verzi la semințe, sau cu cele ale lui Wink și colaboratorii (1983), care evidențiază că genele responsabile cu transportul alcaloizilor sunt susceptibile mutației, oferind șansa depistării unor plante la care alcaloizii toxici să fie blocați în țesuturile verzi. Noi, considerăm că blocarea sintezei alcaloizilor foarte toxici este consecința interacțiunilor epistatice de tip dd, negative, în timp ce interacțiunea dintre genele locusurilor homozigote (aa) controlează sinteza și translocarea unor alcaloizi mai puțin toxici la semințe (cum ar fi hidroxilupanina care este de zece ori mai puțin toxică decât lupanina sau sparteina) determinând apariția unor genotipuri dulci.

În acest sens, este notabil exemplul liniei L 1336/88 (Bihor/Lublanc) la care studiul dinamicii și acumulării alcaloizilor în semințe evidențiază că între nivelul alcaloizilor aflați în părțile verzi ale plantei (0,08% din s.u.) în faza de „începutul

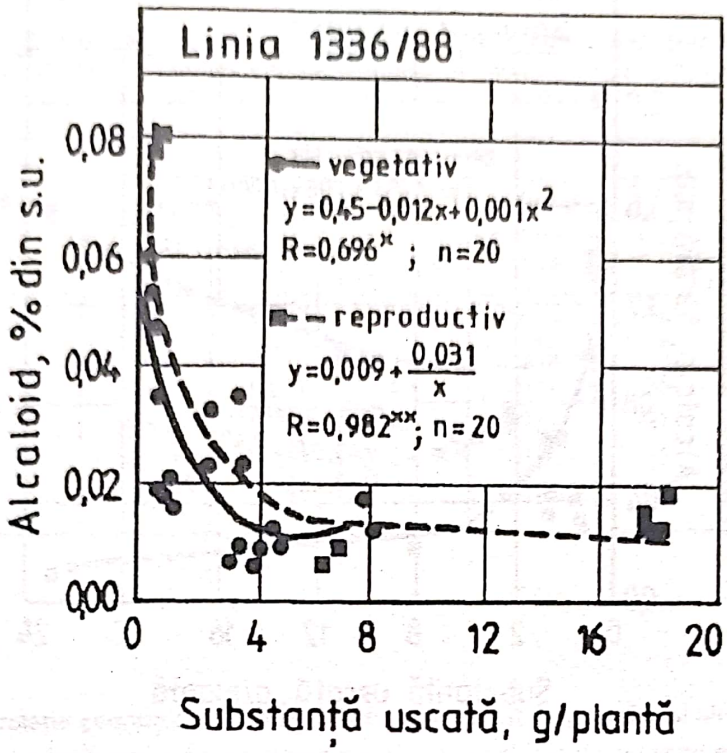


Fig. 3 – Conținutul de alcaloizi din părțile verzi ale plantei și din semințe la linia dulce L 1336/88 (The alkaloids content in green parts and seeds of plants at sweet line L 1336/88

înfloririi" și cel al semințelor mature (0,01% s.u.) există un „deficit cantitativ" (fig. 3), în timp ce la soiul amar – Sătmărean, nivelul conținutului în alcaloizi, în condiții similare, nu se diferențiază semnificativ (fig. 4).

Analiza cantitativă a fiecărui alcaloid prezent în plantă în diferite faze de vegetație ar permite verificarea ipotezei de mai sus, respectiv faptul că în părțile verzi ale plantei sunt prezenți alcaloizi toxici, în timp ce în semințe se găsesc alcaloizi mai puțin toxici, „deficitul cantitativ" fiind, de fapt, o transformare calitativă. Sinteza și translocarea în semințe a unor alcaloizi mai puțin toxici reprezintă dezideratul major al ameliorării lupinului alb. Toate aceste aspecte demonstrează că fenomenul sintezei și translocării alcaloizilor este foarte complex.

Se observă, ca element pozitiv pentru procesul de ameliorare la variantele studiate, că în exprimarea fenotipică a conținutului de alcaloizi un loc preponderent îl ocupă factorul genetic, după cum relevă studiul ponderii variantei genetice în cadrul variației totale (tabelul 5).

Valorificarea variației genetice la toate încrucișările depășește ponderea de 50% din varianța totală (58–75%) dovedind că, fără a subestima influența factorilor de mediu asupra stabilității acestui caracter, potențialul genetic are un rol important, fapt confirmat și de valorile coeficienților de ereditate (HL și HS).

Scanned with OKEN Scanner

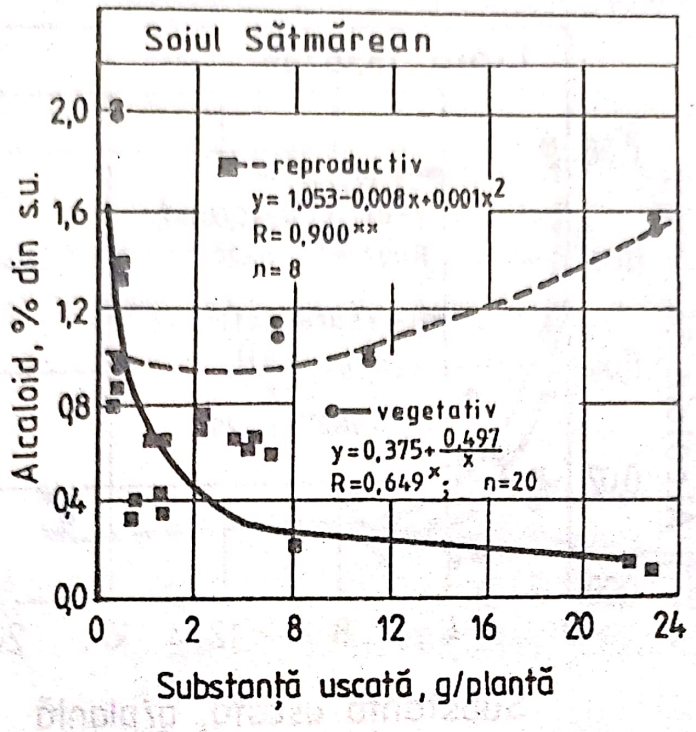


Fig. 4 – Conținutul de alcaloizi din părțile verzi ale plantei și din semințe la soiul amar Sătmărean (The alkaloids content in green parts and seeds of plants at bitter variety Sătmărean)

Deoarece se consideră că una din funcțiile alcaloizilor este aceea de a transporta și stoca azotul, trecând împreună cu aminoacizii prin phloem și fiind stocați ulterior împreună cu proteinele (Wink și colab., 1983), s-a studiat relația dintre alcaloizi și proteine. După cum se observă, corelația genetică și fenotipică dintre proteine (N × 6,25) și alcaloizi este negativă și foarte strânsă (tabelul 6), ceea ce sugerează că există posibilitatea îmbunătățirii simultane a celor două însușiri de calitate ale lupinului alb, prin utilizarea metodelor de selecție recurentă și reciproc recurentă.

CONCLUZII

▼ Biosinteza și translocarea alcaloizilor chinolizidinici în plantele de lupin reprezintă un proces biochimic și genetic complex.

▼ Nivelul ridicat al alcaloizilor din plantele amare se află sub controlul genelor dominante.

▼ Conținutul redus al alcaloizilor din soiurile dulci reprezintă efectul acțiunii genelor recesive și al interacțiunilor nealelice de tip epistatic.

▼ Identificarea și selecția segregantelor transgresiv negative, foarte dulci, în cazul încrucișărilor dintre cele două categorii de lupin (dulci și amare) sunt posibile începând cu generația F_2.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5

Ponderea variației genetice și a variației mediului în cadrul variației totale și coeficienții de ereditate
(The level of genetic and environmental variance in total variance and heredity coefficients (HL and HS)

Încrucișarea (Crosses)	Varianța (Variance)					Coeficient de ereditate (Heredity coefficients)	
	totală (total)	genetică (genetic)	% VG din VT (% VG from VT)	mediului (environ-mental	% VM din VT (% VM from VT)	HL	HS
Bihor/Nyirsegi	0,1	0,058	58	0,042	42	0,58	0,47
Nyirsegi/Bihor	0,15	0,11	75	0,038	25	0,75	0,54
Bihor/Lublanc	0,06	0,039	65	0,021	35	0,65	0,53
Lublanc/Bihor	0,949	0,034	69	0,015	31	0,69	0,63
Bihor/Blanca	0,049	0,031	63	0,018	37	0,63	0,49
Bihor/Hansa	0,066	0,049	74	0,017	26	0,74	0,62

Tabelul 6

Coeficienții de corelație genotipici și fenotipici între conținutul de proteine și alcaloizi (Generația F_2)
(The genotypic and phenotypic correlation coefficients between protein and alkaloids content (F_2 progeny)

Încrucișarea (Crosses)	r x y	R x y	b x y
Bihor/Nyirsegi	–0,635	–0,460	–0,593
Nyirsegi/Bihor	–0,650	–0,508	–0,770
Bihor/Lublanc	–0,529	–0,405	–0,698
Lublanc/Bihor	–0,738	–0,601	–0,881
Bihor/Blanca	–0,773	–0,593	–0,937
Bihor/Hansa	0,685	–0,546	–0,811

▼ Corelația genetică dintre proteine și alcaloizi sugerează existența unor interferențe de cooperare și echilibru (inhibare), ca parte a lanțurilor metabolice ale proteinei și alcaloizilor.

▼ Ameliorarea simultană a celor două caractere este posibilă prin metodele selecției recurente și reciproc recurente.

GENETIC STUDY OF THE ALKALOIDS CONTENT IN WHITE LUPINE (*LUPINUS ALBUS* L.)

SUMMARY

The features of genetic determinism concerning to quinolizodine alkaloids biosynthesis and translocation in lupine, in backcross system with five parental forms (bitter and sweet) were analyzed.

The results show that in heredity of this biochemical complex process, genetic activity of dominance and additive interactions are involved.

The phenotypical and genotypical correlation among proteins and alkaloids evinces some cooperation and equilibrium relationships which denote metabolic pathways between two mentioned components; the simultaneous improvement of these traits only by recurrent selection method is possible.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Anisziewski T., 1993 – Nutritive quality of alkaloid poor washington lupin (*L. polyphyllus* Lindl var SF/TA) as a potential protein crop. J. Sci. Food. Agric., 61: 409–421.

Baer E. (Von) and Gross R., 1971 – Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, 79: 52–58.

Berthaut J., Sixdenter G., 1977 – Les lupins-mise au point et premièrs resultats sur les cultures de printemps. Nouvelles des fourages a l'INRA.

Ceapoiu N., 1968 – Metode statistice aplicate în experienţele agricole şi biologice Bucureşti. Ed. Agro-Silvică, Bucureşti.

Dencescu A. S., 1980 – Teza de doctorat I.A.N.B., Bucureşti.

Fritea Minodora, Sârca Cruciţa, 1993 – Punct de vedere cu privire la dinamica cumulării alcaloidului la specia *Lupinus albus* L. Probl. genet. teor. aplic., XXV, 2: 87–98.

Gamble E. E., 1962 – Gene effects in corn (*Zea mays* L.) I. Separation and relative importance of gene effects for yield. Canad. J. Plant Sci., 42, 2: 339–348.

Hackbarth J., Troll H. J., 1959 – Lupinenals Kornerleguminosen und Futterpflanzen. In: Kappert-Rudorf, Handbuch Pflanzenzuchtg. 2 Aufl., Bd. IV: 12–19.

Hagima Ioana, Mihăilescu F., Minodora Fritea, 1994 – Biochemical characterization of some white lupine genotypes (*Lupinus albus*). Rom. Agric. Res., 1: 13–17.

Hartmann TH., 1988 – Secondary metabolism of lupins: biosynthesis, translocation and accumulation of the quinolizidine alkaloids. In: Proc. 5th. International Lupin Conference, Poznan: 64–78.

Hill G. D., 1977 – The composition and nutritive value of lupine seed. Nutrition Abstracts and Reviews, P. 47: 511–529.

Pate J. S., Williams W., Farrington P., 1977 – Grain Legume Crops: 14–28.

Sengbusch R. (Von), 1942 – Susslupinen und Ollupinen Landw. Hb. 91, 5.

Turbin N. V., Anohina V. S., 1973 – Geneticeskoe izucenie alkaloidnosti u lupina. Dokl., Akad., S-h Nauki V. I. Lenina, 13: 3–6.

Wiewiorowski M., Skolik J., 1959 – Photometrische Microbestimmung der Lupinus alkaloide. Rocz. Chemo, 31: 461–469.

Williams W., Harrison B. E. M., Jayasechera S., 1984 – Genetical control of alkaloid production in *Lupinus mutabilis* and the effect of mutant allele „mutal" isolated following chemical mutagenesis. Euphytica, 33: 811–817.

Williams W., 1984 – Lupins in crop production. Outlook on agriculture, 13, 2: 69–76.

Wink M., Hartmann Th., Witte L., Theuring C., Volz V., 1983. Accumulation of QA in plants and cell suspension culture lupinus s.o. Planta Med., 48: 253–257.

Wink M., 1990 – Plant breeding: low or high alkaloid content? In: Proc. 6th International Lupin Conference Temuco-Pucon, Chile: 326–334.

Scanned with OKEN Scanner

CONTRIBUȚII LA ELABORAREA UNOR NOI PROCEDEE DE SPORIRE A VARIABILITĂȚII GENETICE LA TOMATE

GH. CHIRIAC, V. BUJOREANU*

Obținerea recombinatelor se bazează pe procesul de hibridare, însă numărul și spectrul lor sunt condiționate de distribuirea neîntâmplătoare a schimburilor cromatidice și limitarea multiplelor crossingovere datorită interferenței alelelor ce determină mărirea frecvenței acestora precum și recesivității. Depășirea acestor limite poate fi posibilă în cele mai neobișnuite condiții (Zhuchenko, 1980). Nu este exclus ca virusurile, care sunt considerate ca paraziți la nivel genetic (Diener, 1963), să creeze asemenea condiții. Unele relatări din literatura de specialitate vin să confirme aceste presupuneri. În acest sens mai cunoscut este fenomenul „aberant ratio" indus la porumb de virusul mozaicului dungat al orzului (Barley Stripe Mosaic Virus) (Sprague și McKinney, 1966), virus care provoacă mutații la orz (Sandfaer, 1963) și grâu (Linde-Laursen și Siddiqui, 1974). Datorită efectelor genetice pe care le provoacă virusul menționat la grâul de primăvară, a fost elaborată o metodă netradițională de inducere a variabilității genetice la această cultură (Burdun și colab., 1982).

Lucrarea prezintă rezultatele primei etape în studierea efectelor virusului mozaicului tutunului V.M.T. (Tobacco mozaic virus) asupra populațiilor provenite de la tomate infectate.

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

Ca material biologic s-au folosit cinci hibrizi intraspecifici de tomate F_1 marcați la cromozomii 2 și 6 $\left(\frac{++}{d\ aw}, \frac{++}{c\ m-2}\right)$ și hibrizii F_1 și F_2 dintre soiurile Licurici și Prizior.

* Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova

Materialul marcat s-a infectat mecanic cu tulpina zero a V.T.M., în timpul înmuguririi primului ciorchine. Ca martor iau servit tomatele neinfectate, care nu manifestau nici un simptom de boală şi nu conţineau în ţesuturi germeni patogeni. Momentul apariţiei virionilor în muguri meiotici a fost stabilit prin fixarea şi analizarea probelor, cu o periodicitate de 12 ore. S-a utilizat testul ISEM (immunosorbent electron microscop) (Milne şi Luisoni, 1974). La fiecare trei zile pe parcursul unei luni s-au fixat mugurii meiotici folosind metoda descrisă de Pauşeva (1974). Frecvenţa chiasmelor a fost stabilită studiind preparate temporare la microscopul optic BIOLAR. Bivalenţii au fost clasificaţi, în grupe, după numărul şi configuraţia chiasmelor (Hirotami T. Imai şi Kazuo Moriwaki, 1982). Procentul de recombinări în segmentele marcate a fost determinat pe baza analizei descendenţilor proveniţi din autopolenizarea hibrizilor F_1, sau folosind test-crossul.

Materialele pentru variantele experimentale şi de control de la hibrizii dintre soiurile Licurici şi Prizior au fost obţinute astfel: hibrizii F_1 au fost infectaţi în perioada înmuguririi primului ciorchine şi pe parcursul a şase zile de la apariţia primelor simptome ale bolii, s-au marcat muguri aflaţi la stadiul de meioză. Seminţele din fructele etichetate au servit ca material pentru variantele experimentale – cele culese de pe plantele virozate, iar pentru cele martor – cele provenite de la tomate sănătoase. La hibrizii F_2, una şi aceeaşi plantă servea ca sursă de seminţe pentru varianta experimentală şi pentru martor. Tomatele au fost infectate în perioada înmuguririi celui de-al doilea ciorchine. Mugurii, la care meioza a decurs până la infectarea plantelor, au servit ca sursă de seminţe pentru varianta martor, iar cei la care meioza a durat de la apariţia simptomelor de boală şi terminând cu a şasea zi – pentru varianta experimentală. Fiecare plantă F_2 era un genotip aparte fiind numerotate $F_2(1) - F_2(28)$. S-au folosit genotipurile care au avut mai mult de 100 seminţe pentru variantele experimentale ($F_1(12)$, $F_1(15)$ şi $F_1(28)$).

Populaţiile obţinute din combinaţiile Licurici x Prizior au fost cultivate în câmp conform tehnologiei folosite în Republica Moldova şi analizate după o serie de caractere, cum ar fi: înălţimea plantelor, numărul de frunze şi ciorchini, numărul de fructe pe primii doi ciorchini şi în total per plantă, greutatea fructelor de pe ciorchinii 1 şi 2 şi per plantă, greutatea medie a unui fruct, perioada de coacere, conţinutul în substanţă uscată, conţinutul de zahăr şi vitamină C în fructe, aciditatea, rezistenţa la exces de săruri.

Datele au fost prelucrate statistic la microcalculatorul SMEVM conform pachetului RISS şi a complexului de programe genetico-statistice elaborate la Institutul de Genetică al Academiei de Ştiinţe a Moldovei.

Scanned with OKEN Scanner

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Este ştiut faptul că gradul de manifestare a virozelor la plante depinde de faza infectării plantelor şi durata infecţiei (Gibbs şi Harrison, 1976). Prin investigaţiile noastre s-a stabilit că un efect recombinant mai pronunţat se înregistrează în cazul infectării tomatelor cu V.M.T. în perioada înmuguririi primului ciorchine. Referitor la durata infecţiei s-a înregistrat o scădere considerabilă a capacităţii germinative a polenului, a dimensiunilor tuburilor polinice şi a diametrului grăunciorilor de polen, la plantele infectate, în comparaţie cu martorul sănătos, începând cu apariţia primelor simptome exterioare ale mozaicului comun (Chiriac şi colab., 1990). De aceea, mai întâi s-a stabilit gradul de modificare a numărului de chiasme la o celulă mamă a polenului (CMP) şi procentul de recombinante în segmentele d-aw şi c-m-2, în funcţie de durata infecţiei, momentul detectării primilor virioni şi creşterea concentraţiei lor în stamine. S-a constatat, că particulele virale intacte sunt prezente în mugurii meiotici la 6–7 zile după infectare. Pe parcursul a 3–5 zile numărul de particule virale în stamine se măreşte brusc, după care rămâne la un nivel relativ constant (tabelul 1).

Tabelul 1

Creşterea capacităţii de infectare a sevei staminelor (% faţă de cel al sevei limbului, diluat de 10 ori)

(Increase in the stamena sap infection (% of the infectivity leaf lamina sap, diluted 10 times))

Numărul de zile după infectare (Days after infection)	Experienţa 1 (Treatment 1)	Experienţa 2 (Treatment 2)
6	0,0	1,0
7	5,0	17,7
8	15,9	108,3
10	62,2	128,5
12	54,0	135,6
19	55,2	100,6

Deosebiri esenţiale la nivelul recombinărilor la tomatele infectate, comparativ cu cele sănătoase, apar odată cu primii virioni în mugurii meiotici şi se accentuează cu mărirea capacităţii de infectare a staminelor, astfel încât ating cota maximă la a 9-a – a 12-a zi după infectare, ceea ce coincide cu cea mai mare concentraţie a virionilor şi cu apariţia primelor simptome exterioare ale bolii. În această perioadă frecvenţa chiasmelor interstiţiale creşte de 2–3 ori, iar procentul de recombinări între markerii d şi aw cu 64,6–123,4% la acest nivel se menţine timp de 5–7 zile, după care scade treptat (Chiriac, Nastas, Bujoreanu, 1992). Micşorarea treptată a diferenţei dintre variantele martor şi cele experimentale poate fi cauzată de faptul, că virusurile, de regulă, se acumulează în concentraţii mai mari în organele infectate sistemic iniţial, pe când în cele ce apar ulterior se întâlnesc în cantităţi mai mici (Gibbs şi Harrison, 1976). De asemenea, posibila adaptare fiziologică la viroză este orientată spre menţinerea la un nivel constant a

Scanned with OKEN Scanner

homeostaziei la plantele virozate. Sub influenţa factorilor menţionaţi, procentul de recombinări se micşorează pentru mugurii formaţi mai târziu.

Analiza datelor referitoare la modificarea frecvenţei crossingover-ului în segmentele marcate au evidenţiat efectul specific al V.M.T. Anterior, s-a relatat că la hibrizii atacaţi de mozaicul comun se schimbă numărul de recombinări în segmentul d-aw (cromozomul 2), dar nu şi în segmentul c-m-2 (cromozomul 6) (Chiriac şi colab., 1987), indiferent de genotipul utilizat, ceea ce demonstrează că V.M.T. are efect recombinat pentru unele segmente şi nu afectează crossing-overul în alte zone marcate. Cele menţionate au o importanţă deosebită în sensul că evidenţiază posibilitatea modificării nu numai a frecvenţei recombinărilor ci şi a spectrului lor, deoarece în condiţiile unor efecte specifice se produce deplasarea schimburilor cromatidice în acele zone unde ele nu au avut loc, făcând posibilă apariţia unei noi variabilităţi (Zhuchenko şi Korol, 1985). Procentul de recombinări în zona marcată a cromozomului 6 c-m-2 nu s-a schimbat la tomatele infectate cu V.M.T., în schimb el s-a mărit în cazul aceloraşi hibrizi de la 24,59 ± 1,20 la 34,27 ± 2,86 la plantele infectate cu virusul aspermiei tomatelor (tomato aspermy virus), faptul constatat în investigaţiile noastre mai recente şi care au atestat un înalt grad de specificitate în funcţie de genotipul plantei şi agentul patogen.

Analiza comparativă a plantelor obţinute din mugurii în care meioza s-a terminat cu 24 ore înaintea apariţiei virionilor V.M.T., cu cele obţinute din mugurii în care meioza a avut loc după apariţia germenilor patogeni, demonstrează că populaţiile de plante din primul caz nu se deosebesc cu nimic de cele provenite de la plante sănătoase. Demn de reţinut este că cea mai mică capacitate germinativă a polenului, cel mai mic procent de fructe legate şi cel mai redus număr de seminţe la un fruct, a prezentat materialul provenit din mugurii în care meioza a avut loc pe parcursul a 5–6 zile după apariţia primelor simptome de boală. Astfel, capacitatea germinativă a polenului a fost de 6,7–12,2 ori mai mică decât la plantele neinfectate, procentul de fructe legate din astfel de muguri a fost de 0–10, comparativ cu 64,5–73,2 la martor, iar seminţele provenite din mugurii respectivi nu depăşeau cota de 3–8% din totalul seminţelor produse de o plantă bolnavă a hibrizilor F_2. De aceea, pentru a scoate în evidenţă efectul V.M.T. asupra populaţiilor provenite de la plantele infectate, este necesar să se separe seminţele formate din mugurii în care meioza a avut loc pe parcursul a 5–7 zile după apariţia simptomelor de boală, de restul seminţelor.

Pentru a verifica modificarea procentului de recombinări şi a spectrului variabilităţii genetice la hibrizii intraspecifici de tomate sub acţiunea V.M.T., au fost analizate populaţiile obţinute de la hibrizii F_1 şi F_2 dintre soiurile Licurici şi Prizior (tabelele 2 şi 3). Deosebiri esenţiale între martor şi variantele experimentale

Scanned with OKEN Scanner

s-au înregistrat la unele caractere, cum ar fi: numărul de frunze pe tulpina principală şi de lăstari laterali, înălţimea plantei, numărul de fructe pe primii doi ciorchini etc.

După distribuţia descendenţilor de la plantele infectate comparativ cu martorul sănătos, în ce priveşte valoarea caracterelor studiate, există trei situaţii diferite:

Tabelul 2

Variabilitatea caracterelor în prima generaţie a hibrizilor F_1 (Licurici x Prizior) infectaţi cu V.M.T.

(Traits variability in the progeny of F_1 hybrids (Licurici x Prizior, infected with TMV)

Caractere (Traits)	Martor (Control)	Experienţă (Treatment)
Înălţimea plantei, cm (Plant height, cm)	53,51 ± 0,55	57,63 ± 0,66 $^{+++}$
Frunze pe tulpina principală, nr. (Leaves on the main stem, no)	12,47 ± 0,09	13,54 ± 0,10^{+++}
Ciorchini pe tulpina principală, nr. (Racemes on the main stem, no)	3,88 ± 0,06	3,75 ± 0,06
Fructe pe primul ciorchine, nr. (Fruits on the first raceme, no)	6,17 ± 0,15	5,67 ± 0,14
Fructe pe ciorchinul 2, nr. (Fruits on the second raceme, no)	5,20 ± 0,10	4,98 ± 0,10
Lăstari laterali, nr. (Lateral shoots, no)	5,30 ± 0,09	5,88 ± 0,09 $^{+++}$
Frunze pe lăstarii laterali, nr. (Leaves on lateral shoots, no)	40,13 ± 0,81	46,75 ± 0,83 $^{+++}$
Fructe la plantă, nr. (Fruits per plant, no)	44,26 ± 1,04	46,19 ± 1,09
Ciorchini la plantă, nr. (Racemes per plant, no)	12,59 ± 0,25	13,57 ± 0,25^{++}
Fructe marfă, nr. (Marketable fruits, no)	25,76 ± 0,44	23,67 ± 0,40 $^{++}$
Greutatea fructelor, kg/plantă (Fruit weight, kg/plant)	1,655 ± 0,03	1,487 ± 0,03 $^{+++}$
Greutatea fructelor primului ciorchine, g (Weight of first raceme fruit, g)	396,92 ± 9,57	368,57 ± 10,22
Greutatea fructelor ciorchinelui 2, g (Weight of second raceme fruits, g)	314,70 ± 6,36	300,54 ± 5,81
Greutatea medie a unui fruct, g (Mean weight of a fruit, g)	64,40 ± 0,67	62,71 ± 0,64
Substanţe uscate în fructe, % (Fruits solids content, %)	4,39 ± 0,04	4,19 ± 0,06

$^{++}$, $^{+++}$ – diferenţa este semnificativă pentru $P \leq 0,1$, 0,01

Tabelul 3

Variabilitatea caracterelor în prima generaţie provenită de la hibrizii F_2 infectaţi cu V.M.T.
(Trait variability in the progeny of F_2 hybrids infected with TMV)

Caractere (Traits)	F_2(28)		F_2(15)		F_2(12)	
	Martor (Control)	V.M.T. (TMV)	Martor (Control)	V.M.T. (TMV)	Martor (Control)	V.M.T. (TMV)
Înălţimea plantei, cm (Plant height, cm)	64,16 ± 11,11	56,09 ± 0,89^{+++}	51,64 ± 1,27	58,55 ± 1,05^{+++}	57,48 ± 1,68	51,18 ± 1,63
Frunze pe tulpina principală, nr. (Leaves on the main stem, no)	12,63 ± 0,21	11,71 ± 0,10^{+++}	12,94 ± 0,17	13,39 ± 0,27	12,81 ± 0,22	12,59 ± 0,24
Fructe pe primul ciorchine, nr. (Fruits on the first raceme, no)	7,88 ± 0,34	4,89 ± 0,22^{+++}	5,40 ± 0,38	7,28 ± 0,44^{++}	4,78 ± 0,30	3,82 ± 0,21^{++}
Fructe pe ciorchinele 2, nr. (Fruits on the second raceme, no)	6,17 ± 0,28	4,40 ± 0,12^{+++}	4,27 ± 0,19	5,09 ± 0,21^{++}	0,06 ± 0,17	3,96 ± 0,22
Fructe la plantă, nr. (Fruits per plant, no)	34,34 ± 1,55	32,46 ± 1,18	28,97 ± 2,01	39,54 ± 2,33^{+++}	29,01 ± 1,75	24,79 ± 1,64
Fructe marfă, nr. (Marketable fruits, no)	18,29 ± 0,76	20,46 ± 0,52	16,44 ± 0,80	19,68 ± 0,85^{++}	21,63 ± 1,07	16,98 ± 0,93^{+++}
Lăstari laterali, nr. (Lateral shoots, no)	5,36 ± 0,20	4,72 ± 0,16	4,41 ± 0,17	4,87 ± 0,16	5,08 ± 0,28	4,96 ± 0,23
Frunze pe lăstarii laterali, nr. (Leaves on lateral shoots, no)	38,89 ± 1,53	33,55 ± 0,88^{++}	34,78 ± 1,54	42,49 ± 1,61^{++}	40,27 ± 2,06	40,59 ± 2,42

$^{++}$, $^{+++}$ – diferenţa este semnificativă pentru $P \leq 0,1$, 0,01

1 – fără deosebiri între variantele experimentale şi cele martor;

2 – coincidenţă în ce priveşte valoarea minimă şi maximă a caracterului analizat, însă reprezentarea grafică a şirului de variaţii este modificată după amplasarea punctului ce indică frecvenţa maximă (fig. 1). Aceasta duce la apariţia unor diferenţe esenţiale ale valorii medii între variantele experimentale şi cele martor(tabelele 2 şi 3). Din ansamblul de caractere, la patru hibrizi 33,3% din acestea manifestau asemenea deosebiri, variind de la un genotip la altul între 13,3 şi 50,0% (tabelul 4). Aceste date se află în deplină concordanţă cu rezultatele privind modificarea crossing-over-ului în segmentele marcate, rezultate ce au evidenţiat modificarea schimburilor cromatidice în dependenţă cu segmentul marcat şi genotipul utilizat;

3 – concomitent cu diferenţele dintre valorile medii se constată apariţia sau dispariţia unor clase cu valori minime sau maxime al caracterului analizat (fig. 2, tabelul 5). Apar forme noi faţă de variantele martor în ce priveşte forma plantei şi a ciorchinelui şi numărul de fructe la o plantă. Printre acestea au fost identificate genotipuri cu proprietăţi valoroase în privinţa conţinutului de substanţă uscată şi de zahăr în fructe, mărimea fructului ş.a.

CONCLUZII

▼ Populaţiile provenite de la hibrizii intraspecifici de tomate infectaţi cu tulpina zero a V.M.T. au suferit o modificare a nivelului şi spectrului de

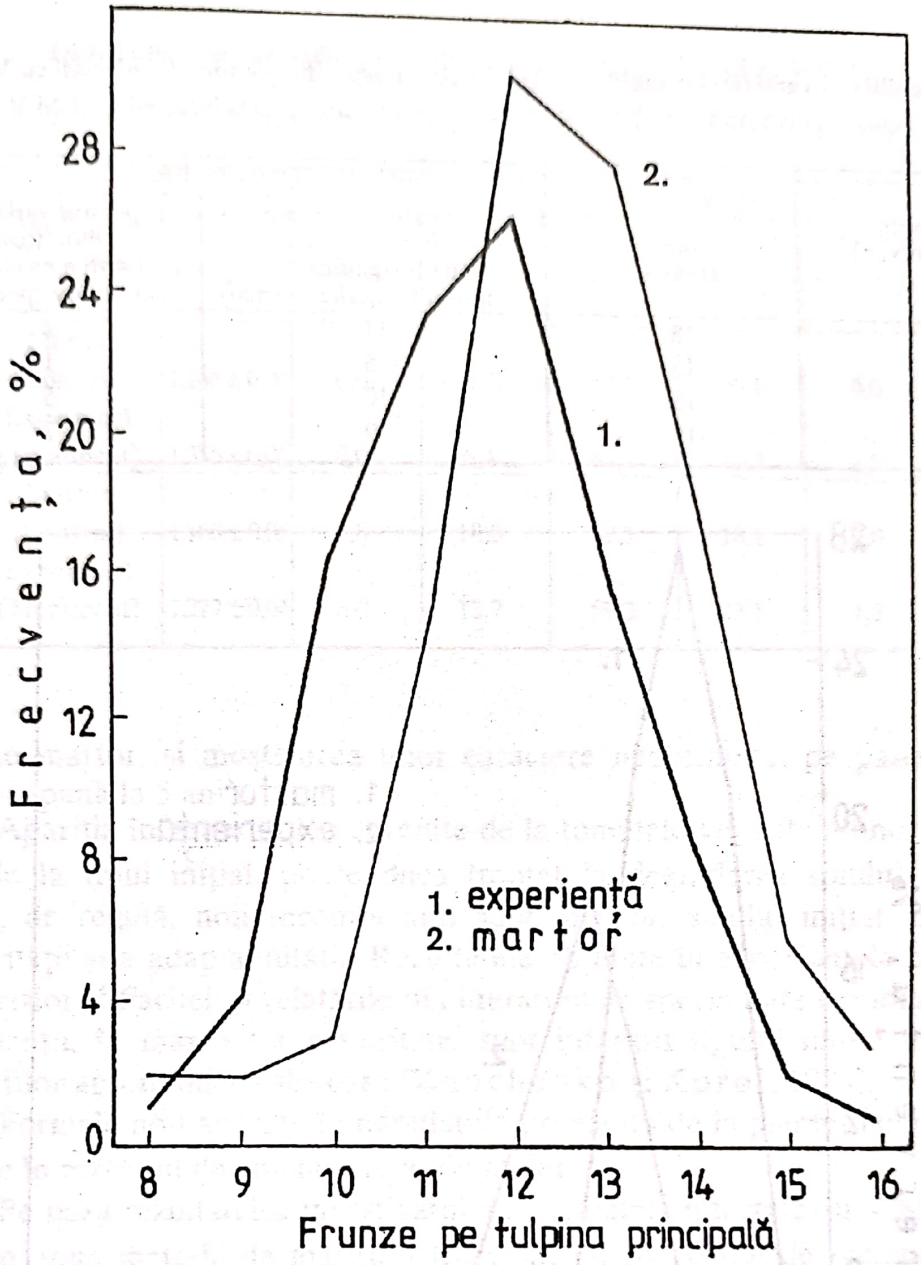


Fig. 1 – Distribuţia descendenţilor hibridului F_2 (28) infectat cu V.M.T. după numărul de frunze pe tulpina principală
(The effect of TMV on the main stem leaf number distribution hybrid F_2 (28)

recombinări, ca urmare a schimbării frecvenţei crossingover-ului în unele zone ale genomului, şi, posibil, apariţia schimburilor cromatidice în acele zone unde în condiţii normale acestea au un nivel foarte scăzut. Ultima presupunere prezintă interes deosebit. Unele date obţinute pe parcursul investigaţiilor noastre ne dau speranţă că această presupunere nu este lipsită de temei. Astfel, remarcăm redistribuirea numărului de chiasme / CMP, în favoarea celor interstiţiale şi creşterea numărului de bivalenţi cu câteva chiasme interstiţiale la plantele infectate; apariţia, în populaţiile provenite de la tomatele virozate, a unor forme care nu se întâlnesc la

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4

Variabilitatea caracterelor cantitative la hibrizii intraspecifici de tomate infectaţi cu V.M.T.
(Quantitative trait variability in intraspecific tomato hybrids infected by T.M.V.)

Genotip (Genotype)	Caractere analizate (Traits analized)		
	total (total)	cu abateri esenţiale de la norme (with significant deviation from the normal)	cu spectrul variabilităţii modificat (with a modified variability spectrum)
F_1	18	11	2
$F_2(12)$	15	5	1
$F_2(15)$	15	10	5
$F_2(28)$	15	9	7

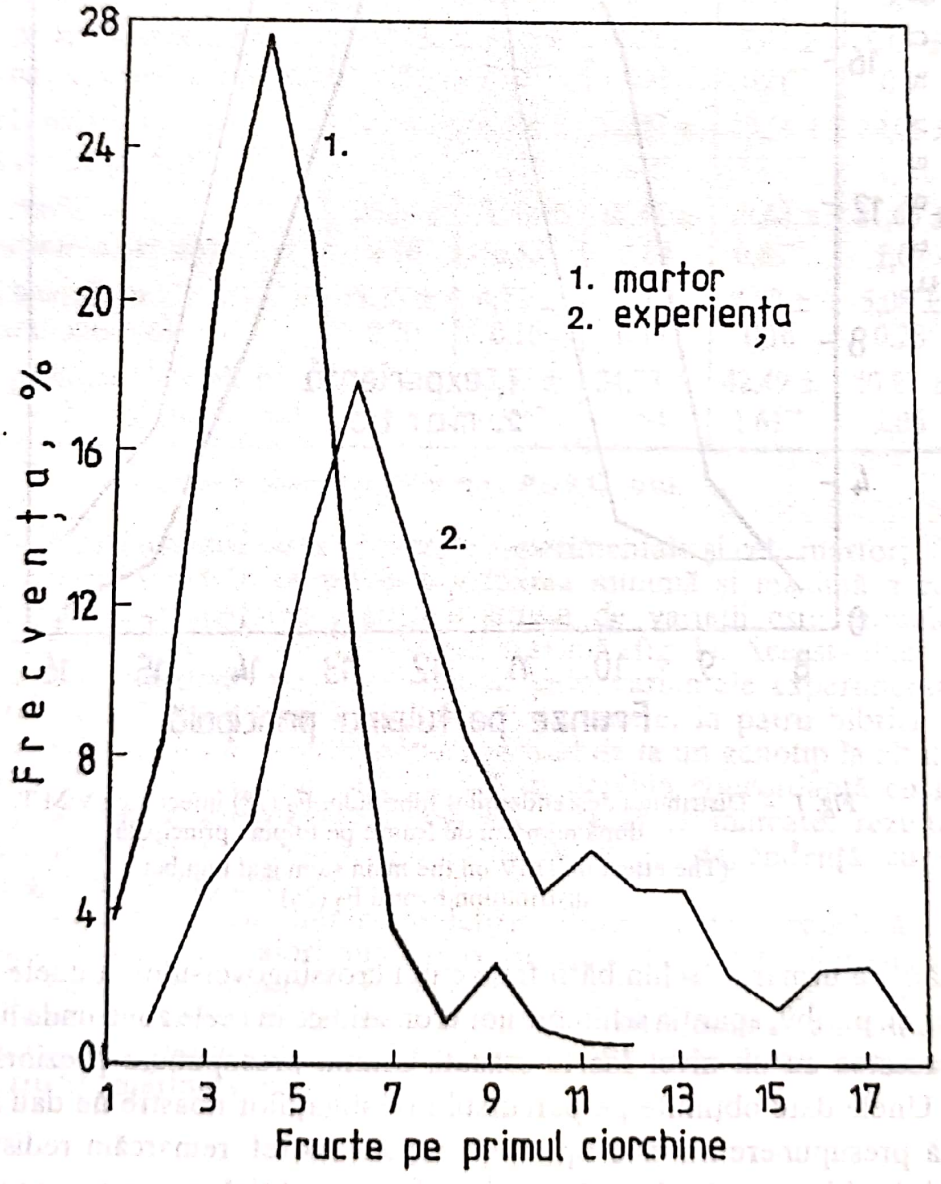


Fig. 2 – Variabilitatea numărului de fructe pe ciorchinele 1 în populaţia provenită de la hibridul F_2 (15) infectat cu V.M.T. (First raceme fruit number variation in the progeny of F_2 (15) infected with T.M.V.)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5

Distribuţia descendenţilor proveniţi de la hibrizii F_2 infectaţi cu V.M.T. după greutatea fructelor la o plantă

(Fruit weight distribution in the progeny of the F_2 hybrids infected with TMV)

Genotip (Genotip)	Variantă (Variant)	X ± x kg/plantă (kg/plant)	% plante cu productivitatea de: (Plants % with productivity)					
			până la (up to) 0,39	0,40–0,69	0,70–1,49	1,50–3,90	3,00–3,49	mai mult (Over) 3,50
F_2(15)	Martor (Control)	1,146 ± 0,06	0,0	26,0	47,9	26,1	0,0	0,0
	Experienţă (Treatment)	1,356 ± 0,06	0,0	6,4	63,1	26,7	2,5	1,4
F_2(28)	Martor (Control)	1,168 ± 0,05	4,8	18,0	59,1	18,1	0,0	0,0
	Experienţă (Treatment)	1,227 ± 0,04	0,0	13,7	59,2	23,1	1,7	1,4

populaţiile martor, şi moştenirea unor caractere neobişnuite, pe parcursul mai multor ani (până la 5 ani).

▼ Apariţia în generaţiile provenite de la tomatele virozate a unor forme cu devieri de la tipul iniţial, poate duce treptat la degradarea soiului respectiv, deoarece, de regulă, noii recombinanţi sunt inferiori soiului iniţial în privinţa productivităţii şi a adaptabilităţii. Rezultatele obţinute în experienţele cu soiurile Nistru, Prizior şi Fachel, şi relatările din literatura de specialitate demonstrează că recombinanţii, în marea lor majoritate, sunt inferiori tipului iniţial în privinţa proprietăţilor agronomice valoroase (Zhuchenko şi Korol, 1985).

▼ Formele nou apărute în populaţiile provenite de la plantele infectate pot fi utilizate în procesul de ameliorare a tomatelor.

▼ Pe baza rezultatelor investigaţiilor la tomatele infectate cu V.M.T. a fost propusă o nouă metodă de mărire a frecvenţei şi spectrului de recombinanţi la hibrizii interspecifici de tomate (Chiriac şi colab., 1990).

CONTRIBUTIONS TO THE ELABORATION OF THE NEW METHODS OF GENETIC VARIABILITY INCREASE IN TOMATOES

SUMMARY

Changes in frequency and spectrum of recombination in tomato interspecific hybrids infected by tobacco mosaic virus were examined. Following according to the occurance of the first disease symptoms, it has been found that the crossing over frequency increased highly during the next 5–7 days. Interstitial chiasma frequency increased with 200% and also, the incidence of recombinants to some segments with 64.6–123.4%. Distribution curves for some traits indicate that viral infection causes either broadening or narrowing of variability spectrum. In the infected hybrid progeny, plants occurred which are lacking or rare in the control. Among these occured variants with commercially valuable traits: larger

Scanned with OKEN Scanner

fruits, increased content of soluble solids sugar in fruits. On the basis of the results obtained, a new technique for increasing recombination in tomato has been proposed.

BIBLIOGRAFIE

Burdun A. M., Panarin I. V., Zabavina, E. S., 1982 – Sposob polucenia rekombinaţii u pşeniţ. Avtorskoe svidetelistvo, 933052.

Chiriac Gh. Ia., Nastas L. A., Bujoreanu V. V., 1987 – Vlianie nulevogo stamma virusa tabacinoi mozaiki na ghenotipiceskuiu izmencivost ghibrida F_1 tomata. Buletinul Academiei de Ştiinţe a R.S.S. Moldoveneşti. Ştiinţe biologice şi chimice, 6: 40–43.

Chiriac Gh. Ia., Galbur L. I., Bujoreanu V. V., 1990 – Effects of tobacco mozaic and tomato aspermy viruses of the pollen of the tomatoes. Buletinul Academiei de Ştiinţe a R.S.S. Moldoveneşti. Ştiinţe biologice şi chimice, 1: 36–39.

Chiriac Gh. Ia., Nastas L. A., Bujoreanu V. V., 1992 - Sposob polucenia rekombinaţii u tomatov. Avtorskoe svidetelistvo 1741677.

Gibbs A., Harrison B., 1976 – Plant Virology. The Principle, London.

Dienner T. O., 1963 – Physiology of virus-infected plants. Ann. Rev. Phytopathol., 1: 197–218.

Hirotami T. Imai, Kazuo Moriwaki A., 1982 – Re-examination of chiasma terminalization and chiasma frequncy in Male Mice. Chromosoma, 85: 439–452.

Linde-Laursen I., Siddiqui K.A., 1974 – Triploidy and aneuploidy in virus infected wheat (*Triticum aestivum*). Hereditas, 76: 152–154.

Milne R. G., Luisoni E., 1975 – Rapid high-resolution immunoelectron microscopy of plant viruses. Virology, 68: 270–274.

Sandfar J., 1973 – Barley stripe mosaic virus and the frequency of triploids and aneuploids in barley. Genetics, 73: 597–603.

Sprague G. F., McKinney H. H., 1966 – Aberrant ratio: an anomaly in maize associated with virus infection. Genetics, 54: 1287–1296.

Zhuchenko A. A., 1980 – Ecological genetics of cultivated plants. Kişinev, 2: 588.

Zhuchenko A. A., Korol A. B., 1985 – Rekombinaţia v evoluţii i selekţii. Moskva: 400.

Scanned with OKEN Scanner

POSIBILITATEA OBȚINERII DIPLOIZILOR MATERNI PRIN HIBRIDAREA INTERSPECIFICĂ *SOLANUM MELONGENA* x *SOLANUM SODOMAEUM*

M. TUDOR*

Un obiectiv major în ameliorarea pătlăgelelor vinete (*Solanum melongena* L.) este obținerea de soiuri sau hibrizi cu rezistență genetică la atacul de boli și dăunători, care produc importante pierderi de recoltă, atât sub aspect cantitativ, dar mai ales calitativ.

Cumularea genelor favorabile ce determină aceste caractere și însușiri complexe impune folosirea unui vast material biologic și o îndelungată perioadă de selecție. Homozigotarea materialului biologic provenit din hibridare este adesea lentă și, de cele mai multe ori, nu se ajunge la o homozigotare completă.

Obținerea rapidă, controlată, a liniilor izogenice la plante ar scurta ciclul de ameliorare cu cel puțin 3–4 ani (Foronghi și Wenzel, 1990).

O cale de obținere a formelor homozigote este transferul și inducerea apomixiei la plante (Anna Koltunow, 1993).

Kirti și Rao (1981), în urma hibridărilor dintre *Solanum indicum* L. și *Solanum tarvum* Sw., specii unidirecționale compatibile, au raportat obținerea diploizilor materni de *Solanum indicum*, prin formarea nucleilor de restituție.

Studiile hibridologice întreprinse de Restaino (1986) au arătat că speciile *Solanum melongena* L. (2n = 24) și *Solanum sodomaeum* L. (2n = 24) sunt semicompatibile și au dat descendențe hibride viabile numai în cazul în care *Solanum sodomaem* este folosită ca genitor femel.

Bhaduri (1932), citat de Jongedijk (1985), studiind megasporogeneza la pătlăgele vinete, a constatat dezvoltarea de celule adiacente arhesporiumului la această specie, ce pot da naștere la saci embrionari nereduși.

Scopul lucrării de față este de a semnala apariția unor diploizi materni în urma hibridărilor dintre speciile *Solanum melongena* L. și *Solanum sodomaeum* L.

* Institutul de Cercetări pentru Legumicultură și Floricultură Vidra

Scanned with OKEN Scanner

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Materialul biologic folosit în prezentul studiu a fost alcătuit din şase soiuri şi cinci hibrizi F_1 de pătlăgele vinete folosite ca genitori femeli şi specia *Solanum sodomaeum* folosită ca părinte polenizator. Toate soiurile şi hibrizii de pătlăgele vinete folosite au frunze nesectate, de culoare verde, lipsite de spini. Fructele sunt de formă alungită şi de culoare violet închisă.

Specia *Solanum sodomaem* este perenă şi creşte sub formă de arbuşti în zonele tropicale. Tulpina plantei este puternic ramificată, iar frunza este adânc sectată, de culoare verde deschis. Ea înfloreşte cu 10–14 zile mai târziu decât specia cultivată. Pe tulpină, peţiolul şi nervura frunzelor prezintă spini tari, de 6–8 mm, de culoare gălbuie. Fructul este de formă globulară, de culoare verde cu pete alburii în zona pistilară.

Semănatul pentru producerea răsadurilor s-a făcut în seră încălzită în luna martie 1993, specia *Solanum sodomaeum* fiind semănată cu 10 zile mai devreme. În a doua decadă a lunii mai răsadurile au fost plantate în câmp. Lucrările de întreţinere au fost asemănătoare pentru ambele specii. În condiţii de câmp, ambele specii au început să înflorească în a doua decadă a lunii iunie. Lucrările de polenizare au fost efectuate în prima decadă a lunii iulie, când ambele specii erau în plină perioadă de înflorire. La polenizare a fost folosită numai prima floare din inflorescenţa care este cea mai fertilă, restul bobocilor florali fiind eliminaţi. Florile ambelor specii sunt asemănătoare având aceeaşi alcătuire, dar florile de *Solanum sodomaeum* sunt de dimensiune mai mică. Au fost castrate câte 15 flori din fiecare soi sau hibrid, din care 10 au fost polenizate cu polen de *Solanum sodomaeum.* Castrarea florilor a fost efectuată înaintea deschiderii corolei, când petalele au căpătat culoarea violacee. O dată cu castrarea s-a făcut şi polenizarea, folosind polen proaspăt recoltat din antere de *Solanum sodomaeum,* când acestea au căpătat culoarea galben-portocalie. Compatibilitatea la hibridare a speciilor a fost apreciată prin numărul de flori legate la 100 flori polenizate.

Recoltarea fructelor polenizate a fost făcută când acestea au ajuns la maturitatea fiziologică. Extragerea şi uscarea seminţelor s-a făcut individual pe fruct. După uscare, alegerea seminţelor normal dezvoltate şi pline a fost făcută cu ajutorul unei lupte de mână. Aceste seminţe au fost puse la germinat în primăvara anului 1994, în ghivece de plastic umplute cu amestec de pământ.

Plantarea în câmp a răsadurilor provenite din aceste seminţe a fost făcută alături de părinţi şi de hibrizii F_1 *Solanum sodomaeum* x *Solanum melongena.*

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Procentul de legare a fructelor la soiurile şi hibrizii F_1 de *Solanum melongena* polenizate cu *Solanum sodomaeum* a fost cuprins între 35 şi 45%. Florile castrate şi polenizate au avortat în totalitate.

Scanned with OKEN Scanner

Fructele rezultate în urma polenizărilor au fost de dimensiuni mai mici decât cele liber polenizate şi s-au menţinut pe plantă până la maturitatea fiziologică. Seminţele proaspăt extrase din aceste fructe au avut dimensiuni apropiate celor provenite din fructele liber polenizate, dar după uscare majoritatea lor s-a dovedit a fi seci, lipsite de germinaţie. Un număr redus de seminţe din fructele polenizate au fost normal dezvoltate, având o germinaţie de 86–92%.

Numărul mediu de seminţe viabile în fructele provenite din florile polenizate cu *Solanum sodomaeum* a fost cuprins între 130,5 la hibridul F_1 „Viorica x L 200" şi zero – la hibridul F_1 „Viorica x Giniac" (tabelul 1).

Tabelul 1

Numărul mediu de seminţe viabile în fruct în urma polenizărilor între diverse genotipuri şi hibrizi F_1 de *Solanum melongena* şi specia *Solanum sodomaeum*

(Mean number of viable seeds per fruit obtained by the pollination of different genotypes and F_1 hybrids obtained between *Solanum melongena* and *Solanum sodomaeum*)

Genitori femeli (♀) – forme homozigote – (Female parent (♀) – homozygous forms –	Nr. mediu de seminţe viabile/fruct (Mean number of viable seeds per fruit)	Genitori femeli (♀) – hibrizi F_1 – Female parent (♀) – F_1 hybrids –	Nr. mediu de seminţe viabile în fruct (Mean number of viable seeds per fruit)
Bucureştene	6,0	L 322 x Banusi	115,0
Danubiana	21,0	Viorica x Giniac	–
Pana corbului	3,5	Viorica x L 200	130,5
Lucia	2,5	Banusi x L 322	124,0
Amurg	3,0	L 51 x L 322	92,0
Thailanda 1	45,0		
$\bar{X}$	13,5		92,3

De remarcat este faptul că numărul mediu de seminţe viabile în fruct la hibrizii F_1 de *Solanum melongena* polenizat cu *Solanum sodomaeum* a fost de peste 6 ori mai mare comparativ cu soiurile polenizate cu această specie.

Dintre soiurile studiate, o provenienţă din Thailanda a avut cel mai mare număr de seminţe germinabile – 45, depăşind de peste 6 ori media celorlalte soiuri, urmat de soiul Danubiana cu 21 seminţe viabile în fruct. Hibrizii F_1 au avut o medie de 92,3 seminţe viabile în fruct, 4 din aceşti hibrizi având peste 92 seminţe viabile. La hibridul F_1 „Viorica x Giniac" polenizat cu *Solanum sodomaeum*, toate seminţele au fost lipsite de germinaţie.

Numărul sensibil mai mare de seminţe viabile la hibrizii F_1 de pătlăgele vinete polenizaţi cu *Solanum sodomaeum* concordă cu rezultatele obţinute la hibrizii interpsecifici de cartof. J a n g e d i j k (1985) a constatat că 10–15% din ovule la toţi hibrizii interspecifici de cartof au conţinut doi sau mai mulţi arhispori.

Plantele rezultate din seminţele viabile provenite din polenizarea cu *Solanum sodomaeum*, sunt normal dezvoltate şi pe deplin fertile. Observaţiile efectuate în

stadiul de răsad şi în câmp asupra plantelor au arătat că acestea au prezentat caracter numai de la specia cultivată. Nici una din aceste plante nu a prezentat caractere tipice speciei polenizatoare, ceea ce arată că embrionii s-au format fără fecundare, prin partenogeneză. Kirti şi Rao (1981) au obţinut, pe lângă diploizi materni de *Solanum indicum*, şi un procent foarte redus de hibrizi între speciile polenizate. Hibrizii F_1 de *Solanum melongena* polenizaţi cu *Solanum sodomaeum* au dat naştere unui generaţii heterogene asemănătoare generaţiei F_2.

Întrucât formarea seminţelor la florile castrate a avut loc doar la cele polenizate cu *Solanum sodomaeum*, rezultă că specia polenizatoare a contribuit la stimularea stigmatului şi a participat, probabil, la formarea endospermului.

Asker (1979, 1980), Nogler (1984), Richards (1986), Asker şi Jerling (1992) – citaţi de Anna Kultonow (1993) – arată că la apomixia aposporică formarea endospermului necesită polenizarea.

Hibrizii F_1 de *Solanum melongena* polenizaţi cu *Solanum sodomaeum* au dat naştere unei generaţii heterogene, asemănătoare unei generaţii F_2, fiind în concordanţă cu observaţiile Annei Kultonow (1993) privind apomixia facultativă. Descendenţa apomicşilor facultativi este o populaţie heterogenă, alcătuită din indivizi homozigoţi. De la plantele cultivate în anul 1994 au fost reţinute seminţe pentru a fi analizate din punct de vedere al stabilităţii caracterelor şi însuşirilor în descendenţă.

Este necesară studierea momentului de formare a nucleilor de restituţie şi a condiţiilor ce pot influenţa acest proces.

CONCLUZII

▼ La speciile *Solanum melongena* şi *Solanum sodomaeum* care sunt semicompatibile s-a reuşit hibridarea şi obţinerea de descendenţe hibride viabile numai în cazul în care *Solanum sodomaeum* a fost folosită ca genitor femel.

▼ Hibridările *Solanum melongena* x *Solanum sodomaeum* nu au reuşit, dar au condus la apariţia unor seminţe în care embrionii s-au format fără fecundare.

▼ Numărul mediu de seminţe viabile în fructele polenizate este influenţat de genotipul plantei mamă, fiind de peste 6 ori mai mare la hibrizii intraspecifici.

▼ Hibrizii F_1 de *Solanum melongena* polenizaţi cu *Solanum sodomaeum* au dat naştere unei generaţii heterogene asemănătoare generaţiei F_2.

SOME POSSIBILITIES OF OBTAINING THE MATERNAL DIPLOIDS BY MEANS OF INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION METHOD BETWEEN *SOLANUM MELONGENA* x *SOLANUM SODOMAEUM*

SUMMARY

In oder to transfer the resistance to will disease produced by *Verticillium dahliae* Kleb., from the wild species *Solanum sodomaeum* L. (2n = 24) in eggplant crops (*Solanum melongena* L., 2n = 24) the author has been made a breeding program consisting of reciprocal hybridization between these species.

Scanned with OKEN Scanner

Taking into account the results obtained, the author concluded that the two species are semi-compatible. It has been shown that the hybridizations were successful and produced viable seeds only when the species *Solanum sodomaeum* was used as maternal parent. These F_1 hybrids (*Solanum sodomaeum* x *Solanum melongena*) have been shown both intermediate features between the two species, and specific features belonging to one or another parent.

The flowers of the varieties and hybrids of *Solanum melongena* which were pollinated with pollen grains of *Solanum sodomaeum* have set fruits, but in most of the cases, their seeds were unviable. The plants obtained from the well developed and viable seeds from such fruits not presented the characteristics and features from the polliniferous species, their embryons were born in the absence of the fecundation process.

The number of viable seeds obtained per fruit was different according to the genotype of *Solanum melongena* used. It was pointed out that in F_1 hybrids between *Solanum melongena* (♀) and *Solanum sodomaeum* (♂) the number of viable seeds was six times higher than in pollinated varieties.

BIBLIOGRAFIE

Anna Koltunow, 1993 – Apomixis: Embryo, sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. Plant Cell., 5: 1425–1437.

Foronghi-Wehr B., Wendel G., 1990 – Recurrent selection alternating with haploid steps – a rapid breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeders. Theoretical and Applied Genetics, 80; 564–568.

Jongedijl E., 1985 – The pattern of megasporogenesis and megagametogenesis in diploid *Solanum* species hybrids. Its relevance to the origin of 2n-eggs and the induction of apomixis. Euphytica, 34; 599–611.

Restaino F., 1986 – Contributo al miglioramento della melanzana per caracterii agronomici, tehnologici e per bioresistenze. Agricultura Ricerca, vol. 60: 3–14.

Scanned with OKEN Scanner

INSTABILITATEA CARIOTIPULUI LA CULTURILE DE CALUS DE *SOLANUM MELONGENA L.*

AURELIA IONESCU*

La culturile *in vitro*, atunci când se asigură proliferarea sub formă de calusuri sau suspensii, pe medii lichide, celulele plantelor prezintă o pronunţată variabilitate a numărului şi a morfologiei cromozonilor (D'Amato, 1978, 1986; Sunderland, 1977; Bayliss, 1980; Gresshoff şi Doy, 1972). Instabilitatea cromozomală poate duce chiar la pierderea capacităţii regenerative (Torrey, 1967). Pe de altă parte, modificările numerice ale numărului de cromozomi pot fi folosite ca sursă de variabilitate genetică, incluzând poliploidia, pentru ameliorarea plantelor (Murashige şi Nakano, 1966; Larkin şi Scrowcroft, 1981).

Constantin (1981) sugerează că diferiţi componenţi hormonali din mediile de cultură joacă un rol important în realizarea instabilităţii cromozomale.

Lucrarea de faţă îşi propune să analizeze efectul condiţiilor de cultură *in vitro* asupra frecvenţei modificărilor numerice şi structurale ale cromozomilor în calusurile induse din antere la pătlăgelele vinete.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Materialul biologic utilizat în experiment este reprezentant de genotipuri de *Solanum melongena* L. Pentru iniţierea culturilor cu polen în antere în stadiul uninucleat, acestea au fost incubate 8 zile la întuneric la +35°C, pe mediul de cultură CT cu 5 mg kinetină/l şi 5 mg 2,4-D/l, apoi au fost transferate în a 12-a zi pe mediile de dezvoltare R_b şi R_c, suplimentate cu 0,2 mg BAP/l şi 0,1 ANA/l şi, respectiv, 0,01 mg k/l şi 0,01 AIA/l.

Pentru efectuarea studiilor citologice, calusurile au fost recoltate dimineaţa între orele 9–11 şi puse în apă distilată la temperatură scăzută (1–4° C). După 24 ore, materialul a fost fixat în fixatorul alcool-acid acetic 3:1.

* Institutul de Cercetări pentru Legumicultură şi Floricultură, Vidra

Pentru efectuarea preparatelor, materialul a fost spălat cu alcool 70% și apoi hidrolizat cu 1 HCl, la 600°C, timp de 10 minute.

Colorarea materialului s-a realizat cu reactiv Schiff.

Frecvența celulelor care au prezentat anomalii cariotipice a fost calculată în procente.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pe baza analizelor citologice s-a stabilit că formarea calusurilor a avut două surse: una din microscopori și alta din țesuturile somatice ale peretelui anterei. Calusurile s-au deosebit sub aspect morfologic, activitatea proceselor fiziologice și capacitatea de diferențiere:

a) calus flasc, translucid, galben ce nu evidențiază primordii foliare, degenerativ;

b) calus compact, alb-gălbui;

c) calus fiabil alb-gălbui.

Pe suprafața calusurilor de tip b și c s-au observat centrii meristematici la nivelul cărora s-au înregistrat procese de morfogeneză.

Studiul citogenetic efectuat asupra calusului primar a pus în evidență celule cu număr diferit de cromozomi (tabelul 1).

Tabelul 1

Frecvența celulelor cu număr diferit de cromozomi în calusurile primare
(Frequency of cells with different chromosome numbers in strains of primary callus)

Metafaze număr (Methaphase number)	Frecvența celulelor, % (Cell frequency, %)				
	x	2x	3x	4x	aneuploid
70	15,1	33,3	1,3	6,5	30,1
20	26,5	14	4,0	6,3	43,0
90	19,0	16	4,0	17,0	15,0
10	–	19	23,7	5,7	24,7

Frecvența celulelor haploide (n = 12) a variat de la 0 la 26,5%. O mare parte a populației (14–33,3%) a prezentat celule diploide (2n = 24). Celulele triploide (3n = 36) și tetraploide (4n = 48) au reprezentat 5–26,3%.

Frecvența celulelor cu număr aneuploid cu cromozomi în număr variabil de la hipohaploid până la mai mult de 12 cromozomi a fost de 0,8–2,5%.

Analiza citogenetică a calusului din prima subcultură a relevat o mare diversitate în ceea ce privește incidența celulelor haploide. Frecvența acestora a variat între 5–60%.

Pe măsura creșterii vârstei calusurilor, frecvența celulelor haploide a descrescut odată cu creșterea numărului celulelor poliploide și aneuploide.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatele studiului citogenetic efectuat în perioada de inducere şi creştere a calusurilor cu capacitatea morfogenetică diferită au evidenţiat că, indiferent de natura explantului şi de genotip, apar aceleaşi tipuri de anomalii cariotipice (poliploidie, aneuploidie, restructurări cromozomale), lucru confirmat şi de studiile şi datele prezentate şi la alte specii de plante (Sacristan, 1971; Sree Ramulu şi colab., 1976; Ancora şi colab., 1977).

CONCLUZII

▼ Calusul generat a prezentat trei forme de regenerare diferite; celulele au avut heterogenitate mare în ceea ce priveşte numărul şi mărimea cromozomilor.

▼ Frecvenţa celulelor haploide a variat de la 0 la 26,5% în calusul primar, pe măsura creşterii vârstei calusurilor, iar frecvenţa celulelor haploide a descrescut odată cu creşterea numărului de celule haploide şi aneuploide.

INSTABILITY OF KARYOTYPE IN CALLUS CULTURES OF *SOLANUM MELONGENIA* L.

SUMMARY

In a cytological study, performed on 3 types of callus culture, differing in morphology, activity of physiological processes and capacity for differentiation, cells showed considerable heterogenity in chromosomes number and size.

Differences in the cells were apparent not only between callus types but also within a single callus type.

The most appreciable changes in karyotype were found in cell culture characterized by a fairly rapid weight and absences of capacity for photosynthesis and shoot regeneration.

The cytogenetic study performed on primary callus evidentiated a variety of chromosome numbers in callus cultures n = 0–26,5%, 2n = 14–33,3%, 3n = 0–26,3 and 4n = 6–26,3%.

Since, in the cell cultures nondifferentiation callus there is a rapidly genotypic evolution, the callus could be an important source for somaclonal variations.

BIBLIOGRAFIE

Ancora G., Sree Ramulu K., Devreux M., 1977 – *In vitro* culture of anthers and stem internodes of *Lycopersicon peruvianum:* Nuclear DNA determination in calii and cytological analyses of regenerated plants. Z. Pflanzenphysiol Bd. 82 S: 377–388.

Bayliss M.W., 1980 – Chromosomal variation in plant tissue in culture. Intern. Rev. Cytol. Suppl. 11 A: 113–141.

Constantin M.J., 1981 – Chromosome instability in cell and tissue cultures and generated plants. Environ. exp. Bot., 21: 359–360.

D'Amato F., 1978 – Chromosomal variation in cultured cells and regenerated plants. In: Frontiers of plant tissue culture (Ed. Thorpe), Calgary, Canada: 287–295.

D'Amato F., 1986 – Spontaneous mutations and somaclonal variation. In: Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. International Atomic Energy Agency Vienna.

Gresshoff P.M., Doy C.H., 1972 – Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta, 107: 161–170.

Larkin P.J., Scrowcroft W.R., 1981 – Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60: 197–214.

Scanned with OKEN Scanner

EVALUAREA CAPACITĂȚII ANDROGENETICE LA DIHAPLOIZII DE *SOLANUM MELONGENA* L.

AURELIA IONESCU *

Inducerea haploizilor, ca şi capacitatea microsporilor de a forma embrioizi sau calus *in vitro,* este un proces complex, controlat de mai mulţi factori, dintre care cei genetici au un rol foarte important. La pătlăgelele vinete, ca şi la alte specii, genotipurile s-au comportat diferenţiat în privinţa inducerii embriogenezei plinice şi a regenerării plantelor din microspori (Chambonnet, 1985, Chambonnet şi colab., 1988; Dumas de Vaulx şi colab., 1989; Gresshoff şi Doy, 1972; Grupul de cercetători chinezi, 1978; Ionescu şi colab., 1986, 1994; Isouard, 1981; Tuberosa şi colab., 1987).

Pentru a putea utiliza haploidia experimentală în scopul obţinerii rapide a dihaploizilor, în cercetări de selecţie *in vitro,* pentru evaluarea frecvenţei şi spectrului variaţiei genetice generate de cultura de antere la această specie, se impune identificarea de gene care conferă capacitate androgenetică superioară în cadrul germoplasmei existente.

Cercetările efectuate la I.C.L.F. Vidra au avut drept scop evaluarea potenţialului androgenetic al unor dihaploizi obţinuţi din combinaţii hibride valoroase, comparativ cu potenţialul hibrizilor respectivi.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Materialul biologic folosit a constat din doi hibrizi F_1 (B_4 x L-142 şi B_2 x S.B.) şi 3 dihaploizi.

Plantele au fost cultivate în câmp, iar bobocii florali au fost recoltaţi în stadiul fenologic corelat direct cu existenţa în antere a microsporilor uninucleaţi.

Anterele prelevate aseptic au fost cultivate pe mediul de cultură CT (Chambonnet şi Dumas de Vaulx, 1983).

* Institutul de Cercetări pentru Legumicultură şi Floricultură, Vidra

Scanned with OKEN Scanner

Culturile de antere au fost inoculate în întuneric, în primele 8 zile, la +35° C. După 12 zile de la data incubării, anterele au fost transferate pe mediile de dezvoltare R_b, suplimentat cu 0,2 mg BA/l şi 0,1 mg ANA /1 şi R_c la care s-au adăugat 0,01 mg K/l şi 0,01 mg AIA/1 în condiţii de fotoperioadă de 12 ore.

Pe măsura apariţiei, produşii androgenetici (calusuri şi embrioni) au fost trecuţi pentru creşterea calusului şi calusare pe mediul R_d.

Pentru a obţine plante, lăstarii au fost trecuţi pe mediul MS.

Au fost înregistrate următoarele date: numărul anterelor cu răspuns androgenetic, numărul produşilor/antenă şi numărul calusurilor care au generat plante.

Au fost analizaţi doi dintre parametrii componenţi ai capacităţii androgenetice: rata anterelor cu răspuns, exprimată prin numărul anterelor cu produşi androgenetici/100 antere cultivate şi producţia de plante regenerate, exprimată prin numărul plantelor/100 antere cultivate.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabelele 1 şi 2 sunt prezentate valorile parametrilor studiaţi, obţinute pe două variante de medii de cultură.

Analiza rezultatelor evidenţiază răspunsurile diferite, la cultura *in vitro*, atât a celor doi hibrizi F_1, cât şi a dihaploizilor derivaţi.

Tabelul 1

Influenţa compoziţiei mediului de cultură asupra răspunsului anterelor şi producţiei de plante la *Solanum melongena* L.

(The influence of the culture medium on the anther response and on the plants yield in *Solanum melongena* L.)

Genotipul (Genotype)	AR/AC x 100		Număr mediu (Mean no.) E + C/AR		E + C/AC x 100		P/AC x 100	
	R_b	R_c	R_b	R_c	R_b	R_c	R_b	R_c
F_1 (B_4 x L 142)	16,66	0	0,2	0	16,66	0	0	0
F_1 (B_2 x S B)	8,33	0	1,60	0	13,88	0	0,65	0
Media	12,49	0	0,90	0	15,27	0	0,65	0
1. DH_1	9,54	0,75	1,85	3,00	17,72	2,27	12,27	1,51
2. DH_2	18,46	4,93	1,95	0	36,15	4,93	26,92	0
3. DH_3	16,66	0	1	0	16,66	0	0	0
Media	14,88	1,91	4,13	1	23,62	3,91	21,24	0,50

AR/AC x100 = antere cu răspuns/antere cultivate (responsive anthers/cultivated anthers)
E + C/AR = embrioni + calusuri/antere cu răspuns (embryos + calli/responsive anthers)
E + C/AC x 100 = embrioni + calusuri/antere cultivate (embryos + calli/cultivated anthers)
P/AC x 100 = plante/antere cultivate (plants/cultivated anthers)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2

Influenţa compoziţiei mediului de cultură asupra răspunsului anterelor şi producţiei de plante la dihaploizii de *Solanum melongena* L.

(The influence of the culture medium on the anther response and on the double haploid plants yield in *Solanum melongena* L.)

Genotipul (Genotype)	$\frac{AR}{AC}$ x 100			$\frac{E+C}{AC}$ x 100			$\frac{P}{AC}$ x 100		
	R_b	R_c		R_b	R_c		R_b	R_c	
S_1	6,75	2,08	4,1	10,81	10,41	10,65	0	4,16	1,65
S_2	12,4	0	8,72	50,41	0	27,35	22,31	0	15,69
S_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DH_1	9,09	0,78	6,05	30,94	3,93	21,32	12,27	1,57	8,35
S_4	20,00	6,06	10,41	30,00	6,06	10,41	0	0	0
S_5	24,24	0	21,62	36,36	0	32,43	12,12	0	10,81
S_6	47,82	4,54	33,82	83,69	4,54	58,08	45,65	0	30,88
DH_2	39,28	4,93	26,69	65,71	4,93	50,26	32,85	0	32,85
S_7	16,66	0	10,00	16,66	16,66	10,00	0	0	0
DH_3	16,66	0	10,00	16,66	16,66	10,00	0	0	0

AR/AC x 100 = antere cu răspuns / antere cultivate (responsive anthers / cultivated anthers)
E + C/AC x 100 = embrioni + calus/antere cultivate (embryos + calli/cultivated anthers)
P/AC x 100 = plante/antere cultivate (plants/cultivated anthers)

Tabelul 3

Răspunsul unor genotipuri F_1 şi DH de pătlăgele vinete la cultura anterelor *in vitro*

(The response of some F_1 genotypes and DH eggplants at *in vitro* anther culture)

Genotipul (Genotype)	$\frac{AR}{AC}$ x 100	$\frac{E+C}{AC}$ x 100	$\frac{E+C}{AR}$	$\frac{P}{E+C}$ x 100	$\frac{P}{AC}$ x 100
B_4 x L 142	12,50	12,5	1	1,3	1,3
B_2 x SB	6,25	10,41	1,66	0	0
Media	9,37	11,45	1,33	1,3	0,65
1. DH_1	6,25	11,93	1,90	0,69	8,23
1. DH_2	13,27	24,17	1,82	0,69	16,58
2. DH_3	16,66	16,66	1,00	0	0
Media	12,06	17,58	1,57	0,45	8,27

AR/AC x 100 = antere cu răspuns/antere cultivate (responsive anthers/cultivated anthers)
E + C/AC x 100 = embrioni + calus/antere cultivate (embryos + calli/cultivated anthers)
E + C/AR = embrioni + calus/antere cu răspuns (embryos + calli/responsive anthers)
P/E + C = plante/antere cu răspuns (plants/responsive anthers)
P/AC = plante pe antere cultivate (plants/cultivated anthers)

1. originea în F_1: B_4 x L 142
2. originea în F_1: B_2 x SB

Scanned with OKEN Scanner

Rata anterelor cu răspuns androgenetic a atins valori superioare pe mediul R_b, la care valorile medii înregistrate au fost mai mari, comparativ cu R_c.

Rezultatele prezentate în tabelul 3 evidențiază faptul că valorile medii ale ratei anterelor cu răspuns la dihaploizi, depășesc semnificativ cotele de răspuns ale anterelor prelevate de la hibrizii F_1.

Frecvența răspunsului anterelor la hibrizii F_1 a fost de 6,25–12,50%, iar la liniile derivate – de 6,25–16,6%. În privința capacității de regenerare de plante, aceasta a variat între 0 și 1,3 % la hibrizii F_1 și între 0 și 16,58% la liniile dihaploide derivate.

CONCLUZII

▼ Între genotipurile evaluate în acest studiu există diferențe majore în ceea ce privește performanța androgenetică.

▼ Rata de regenerare de plante a fost de 0,1–1,3% la hibrizii F_1 și de 0–16,58% la liniile dihaploide derivate.

▼ În germoplasma folosită în programul de ameliorare al pătlăgelelor vinete la I.C.L.F. Vidra, există gene care conferă capacitate androgenetică. Folosirea dihaploizilor în programul de ameliorare poate conduce la economisirea de timp și de mijloace materiale.

EVALUATION OF ANDROGENETIC ABILITY OF DOUBLE HAPLOID IN *SOLANUM MELONGENA* L.

SUMMARY

The androgenetic ability of three double haploids (grouped according to origin) and two F_1 hybrids tested on CT induction culture medium and R_b, R_c media for shoot and root development, measured as anthers response rate and plant regenerated.

The percentage of DH's anthers producing ambryos was better on R_b than R_c medium.

The percentage frequency of responsive anthers in F_1 and DM derived lines ranged between 6,25 and 12,50 and 6,25–16,6 respectively: and the frequency of plant obtained in F_1 and in DH lines ranged between 0–1,3 and 0–16.58 respectively.

The results obtained suggest that the anthers culture could be used as a system of selection for "androgenetic aptitude".

BIBLIOGRAFIE

Chambonnet D., 1985 – Culture d'antheres in vitro chez trois solanacees maraicheres: (*Solanum melongena* L.), la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) et obtention de plantes haploides. These pour obtenir le grade de Docteur d'Université.

Chambonnet D., Dumas de Vaulx R., 1983 – A new anther culture medium performant on various eggplant (*Solanum melongena* L.) genotypes. Eucarpia "Capsicum and Eggplant 83" Vth meeting, 4–7 July 1983, Plovdiv, Bulgaria. Ed. Institute of Genetics – Sofia Bulgaria: 38–41.

Scanned with OKEN Scanner

Dumas de Vaulx R., Chambonnet D., Rode, L.C., Ttraas, J., 1989 – Culture *in vitro* et biologie cellulaire. Raport d'activité 1987–1988. Station d'Amelioration des Plantes maraicheres Avignon – Montfavet, France: 52–58.

Gresshoff P.M., Doy CM., 1972 b. – Development and differenciation of haploid *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomats). Planta, 107: 167–170.

Ionescu A., Tănăsescu M., Şuta E., Tănăsescu C., Ionescu C., Poncu J., 1986 – Rezultate preliminarii privind obţinerea de haploizi la unele specii de legume. Anale I.C.L.F., vol. VIII: 79–87.

Ionescu A., Tudor M., 1994 – Androgeneza *in vitro* la pătlăgelele vinete (*Solanum melongena* L.). Cercet. Genet. Veget. Anim., vol. III: 145–150.

Isouard E., 1981 – Contribution à la mix au point de l'androgenèse haploides pour le definition du caryotype de l'especèse. These de Docteur Ingènieur, Université de Paris Sud, Centre d'Orsay, Juin: 89.

Research group of haploidy breeding, institute of vegetable, chinese academy of agricultural sciences, 1978 – Induction of haploid plants of *Solanum melongena* L. Science Press: 227–232.

Tuberosa R., Sanguineti M. C., Toni B., Cioni F., 1987 – Ottenimento di aploidi in melanzana (*Solanum melongena* L.) mediante coltura di antere. Revista di Sementi Elette, XXXIII, 3: 9–14.

Scanned with OKEN Scanner

STUDII CITOGENETICE LA SPECII DE *CACTACEAE* CULTIVATE *IN VIVO* ŞI *IN VITRO*

MIHAELA CORNEANU, G.C. CORNEANU *

Primele investigaţii citogenetice la familia *Cactaceae* au fost efectuate de Sugima (1931), care a stabilit numărul somatic de cromozoni la câteva specii aparţinând genurilor *Mammillaria* şi *Zygocactus*. Studiile cariologice la *Cactaceae* au luat amploare în deceniile 4–6, când s-a stabilit numărul somatic de cromozomi la un mare număr de specii, o contribuţie deosebită având Johansen (1933); Beard (1937); Spencer (1955) (citaţi de Bolkhovskikh şi colab., 1969) Andersen (1962) ş.a.

Numărul de bază de cromozomi la familia *Cactaceae* stabilit de Sugima (1931); Johansen (1933) şi Beard (1937), (citaţi de Bolkhovsckikh şi colab. (1969), este x = 11, majoritatea speciilor fiind diploide (Corneanu, 1984). Studiile citogenetice efectuate de diferiţi autori în ultimele decenii (Andersen, 1962; Diers, 1961; Powell şi colab., 1991 ş.a.) s-au limitat, de regulă, la stabilirea numărului somatic de cromozomi din celulele somatice, fără întocmirea cariotipului. În plus, aspectul morfologic al cromozomilor prezenţi sugerează că ei sunt în prometafază, cromatidele prezentând de-a lungul lungimii lor diferite grade de condensare. Trebuie menţionat că utilizarea ţesutului radicular ca material biologic şi efectuarea preparatelor microscopice după metoda squash conduce, în majoritatea cazurilor, la spargerea lamelei microscopice (în celule sunt prezentate cristale dure), plăcile (pre)metafizice având cromozomi în planuri diferite. Urmare, plăcile (pre)metafizice la *Cactaceae* sunt reprezentate prin desen şi nu prin fotografii.

Datorită lungimii mici a cromozomilor (sub 5 μm lungime în premetafază), a dificultăţii de efectuare a unor preparate microscopice de calitate, a greutăţii de identificare a perechilor de cromozomi şi a cromozomilor care poartă satelitul, în caracterizarea speciilor de *Cactaceae* numărul somatic de cromozomi este rar utilizat, accentul fiind pus pe caracterizarea lor morfologică şi, mai recent, pe diferite analize biochimice (studiul flavonidelor). În lucrarea „Genetica e piante succulente",

* Universitatea din Craiova

Scanned with OKEN Scanner

Gallo (1986) a prezentat modul de transmitere a unor caractere determinate de gene dominante şi recesive (alături de alte aspecte de genetică clasică), fără referinţe asupra cariotipului *Cactaceelor*. Mausett (1993) a utilizat caracteristicile anatomice ale tulpinii la studiul evoluţiei în cadrul familiei *Cactaceae* (fără aspecte cariologice). Leunberger (1992, 1993) sau Mottram (1993), analizând unele grupe de cactuşi, ca şi Arecesmallea (1993), prezentând unele specii nou descoperite de *Cactaceae*, s-au limitat numai la însuşirile morfologice. În cercetările asupra diversităţii populaţiilor de *Lophocereus schottii*, Parker şi Mamrick (1992) au utilizat însuşirile biochimice sau aspecte ecologice.

Pentru caracterizarea hibridului *Echinocereus* x *Lloydii*, Powell şi colab. (1991) au folosit date obţinute prin analiza biochimică a flavonidelor şi ale numărului de cromozomi somatici.

În România primele investigaţii citogenetice la familia *Cactaceae* au fost efectuate de Corneanu (1984), care a stabilit numărul somatic de cromozoni la specii din genurile *Lobivia, Mammillaria* şi *Rebutia*, alături de studiul relaţiei dintre gradul de poliploidie şi arealul geografic ocupat.

Primele studii privind cultura *in vitro* la *Cactaceae* au fost efectuate în anul 1957 de către King, care a obţinut calus la diferite specii *(Neopalea sp., Pereskia grandiflora, Wilkoxia poselgeri)*, inoculate pe un mediu suplimentat cu 2,4-D. Ulterior, diferiţi cercetători au studiat fenomenul de organogeneză şi au raportat obţinerea de plante *in vitro*. Merită menţionate cercetările efectuate de Mauseth (1977–1979), Minocha şi Mehra (1974), Colomas şi Bulard (1977), Johnson şi Emino (1977, 1979), Krulik (1981), Seeni şi Gnanam (1980), Gaiser şi Laizarte (1981), Sajeva (1982), Andersen (1982) şi alţii (citaţi de Krikorian şi colab., 1983 şi Sajeva şi Ferraino, 1986). În România, studii privind cultura *in vitro* la familia *Cactaceae* au fost efectuate de Corneanu şi colab., (1990, 1991, 1992, 1994) la diferite specii (*Parodia* sp., *Mammillaria* sp., *Aztekium ritteri, Coryphantha*).

Importanţa studiilor citogenetice în cazul culturilor *in vitro* a fost menţionată de diferiţi specialişti.

În culturile de celule şi ţesuturi vegetale *in vitro*, în special în cele originale din calus, s-au constatat modificări ale numărului şi caracteristicilor complementului cromozomial. Aceste deviaţii sunt minime în culturile primare; în subcultură, s-au constatat însă diferenţe substanţiale faţă de caracteristicile normale ale cromozomilor (Krikorian şi colab., 1983). Aceste modificări depind de genotip, fiind minime la *Haplopappus gracilis* (Blakely, 1963), sau mari la alte specii precum *Zea mays* (Straus, 1954) sau *Pisum sativum* (Torrey, 1959); de tipul explant şi de tipul de ţesut analizat (maxime la cultura de calus); de compoziţia mediului de cultură şi concentraţia în care se află diferiţi compuşi chimici.

Prezentul studiu s-a efectuat în scopul stabilirii caracteristicilor cariotipului la o specie provenită din arealul ei natural (*Lobivia incaica*, Peru), precum şi stabilirea numărului somatic de cromozomi şi a lungimii acestora la două specii (*Mammillaria*

Scanned with OKEN Scanner

duwei şi *Coryphantha elephantidens*, obţinute din seminţe (cultura *in vitro)* sau prin multiplicare somaclonală (cultura *in vitro,* fără fenomenul de calusare).

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Investigaţiile citogenetice au fost efectuate la trei specii de *Cactaceae,* aparţinând tribului *Cereeae,* subtribului *Coryphantanae* (*Coryphantha elephantidens* şi *Mammillaria duwei*) şi la subtribul *Echinocereanae* (*Lobivia incaica*).

Pentru evidenţierea cromozomilor s-au utilizat vârfuri de radicele de la plante obţinute din seminţe *in vitro* (ţesut meristematic la *Lobivia incaica,* celule din perişorii radiculari la *C. elephantidens* şi *M. duwei*) şi vârfuri de radicelă (perişori radiculari) de la plantele regenerate *in vitro* prin multiplicarea clonală pe medii fără 2,4-D sau substanţe mutagene care induc formarea de calus la speciile *C. elephantidens* şi *M. duwai.* Utilizarea perişorilor radiculari în studiile citogenetice la familia *Cactaceae* oferă posibilitatea de obţinere a unor preparate microscopice bune prin metoda squash (fără spargerea lamelei). Pentru stabilirea caracteristicilor cromozomilor s-a utilizat următorul protocol de lucru:

- prefixare: soluţie 0,2% colchicină, 2 h 24° C;
- postgerminare: apă de robinet, 15 min., 24° C;
- fixare: amestecul alcool etilic absolut – acid acetic glacial (3 : 1), 2h, 4° C;
- hidroliză: HCl 1N, 5 min. + soluţie 50% HCl, 16 min., 24° C;
- colorare: respectiv Schiff 1%, 60 min., 4° C;
- preparate microscopice tip squash, montate în euparal;
- analiză la microscop AMPLIVAL (20x 40x; 20x 100x).

Pentru stabilirea caracteristicilor cromozomilor la *Lobivia incaica,* au fost utilizate 12 plăci metafazice din ţesutul meristematic radicular. Lungimea cromozomilor la *C. elephantidens* şi *M. duwei* s-a stabilit prin măsurători efectuate direct la microscop în placa metafazică din perişorii radiculari, atât *in vivo,* cât şi *in vitro.*

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Specia *Lobivia incaica* Backbg. este originară din regiunea incaşă Intihuatana, situată în statul Peru. Este o specie diploidă (2n = 22) (Corneanu, 1992), caracteristicile cromozomilor fiind stabilite utilizând seminţe provenite de la plante în arealul natural. Seminţele au germinat în România, plantele obţinute (de la care s-au recoltat radicelele pentru analiza cromozomilor), fiind caracteristice tipului clasic. Cromozomii au lungimea cuprinsă între 3,45 µm şi 1,10 µm (tabelul 1, fig. 1). Două perechi de cromozomi (III şi IX) au centromerul în regiunea submediană, două perechi (X şi XI) cu centromerul în regiunea subterminală, celelalte şapte perechi de cromozomi având centromerul în regiunea mediană (I, II, IV–VIII). Primele două perechi de cromozomi sunt mai lungi decât celelalte

perechi de cromozomi. Nu a fost evidenţiată prezenţa unei constricţii secundare la cromozomii din metafazele analizate.

Tabelul 1

Caracteristicile cromozomilor la specia *Lobivia incaisa* Backbg.
(The chromosomes features in *Lobivia incaisa* Backbg. species)

Cromozomul (Chromosome)	Lungimea cromozom, µm (Chromosome length, µm)			Index centromeric (Centromeric index)	Raport braţe (Arms ratio)	Poziţia centromerului regiune (Centromeric position-region
	braţ lung (long arm)	braţ scurt (short arm)	lungime totală (total length)			
I	2,10	1,35	3,45	39,13	1,55	mediană
II	1,90	1,22	3,15	39,06	1,52	mediană
III	1,90	0,80	2,70	29,63	2,00	submediană
IV	1,45	1,20	2,65	45,28	1,21	mediană
V	1,50	1,00	2,50	40,00	1,50	mediană
VI	1,50	1,00	2,50	40,00	1,50	mediană
VII	1,25	0,90	2,15	41,86	1,39	mediană
VIII	1,00	0,80	1,80	44,44	1,25	mediană
IX	0,90	0,45	1,35	33,33	2,00	submediană
X	0,85	0,25	1,10	22,73	3,40	subterminală
XI	0,85	0,25	1,10	22,73	3,40	subterminală

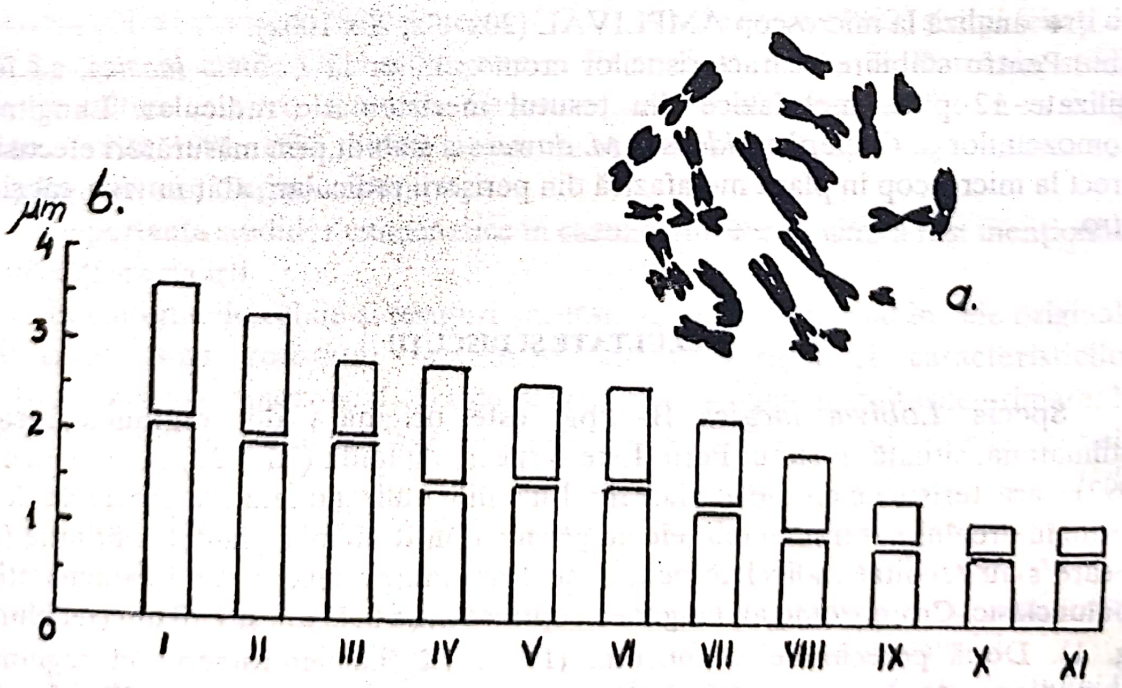


Fig. 1 – Placa metafazică (a) şi idiograma (b) la specia *Lobivia incaica* Backbg. (2n = 22) (The metaphasic plate (a) and idiogram (b) in *Lobivia incaica* Backbg. species (2n = 22)

Scanned with OKEN Scanner

Specia *Coryphantha elephantidens* (Lem.)., originară din Mexic, este o specie diploidă (2n = 22). La plantele obţinute din seminţe (*in vivo*), lungimea cromozomilor variază între 3,20 µm şi 1,20 µm, iar la plantele obţinute *in vitro* – între 4,00 µm şi 1,50 µm (tabelul 2). În ambele cazuri, între prima pereche de cromozomi cu centromerul situat în regiumea mediană şi perechea a doua de cromozomi, se constată o diferenţă mare între lungimea lor. Prezintă o singură pereche de cromozomi cu satelit, construcţia secundară fiind slab distinctă. Această constatare este sprijinită de prezenţa unui singur nucleol în nucleul interfazic.

Specia *Mammillaria duwei* Rog. et Braun poartă numele germanului Walter Duwe, care a identificat-o pe o formaţiune calcaroasă care prezenta humus (Siniscalchi, 1991), de lângă oraşul San Luis de la Paz (Mexic). Numărul somatic de cromozomi şi mărimea lor au fost stabilite utilizând seminţe originare din arealul natural al speciei (Mexic). Plantele obţinute din seminţe au fost utilizate şi pentru studii *in vitro,* prin utilizarea lor ca explante şi inducerea fenomenului de organogeneză. Specia este diploidă (2n = 22) cromozomii având lungimea cuprinsă între 3,00 µm şi 1,15 µm (*in vivo*) şi între 4,00 µm şi 1,90 µm (*in vitro*) (tabelul 2). Prima pereche de cromozomi, în ambele cazuri, având centromerul în regiunea mediană, este mult mai lungă decât celelalte perechi de cromozomi. Prezintă o singură pereche de cromozomi cu satelit, constricţia secundară fiind slab distinctă.

Datorită dificultăţilor înregistrate în depistarea constricţiilor primare şi/sau secundare de-a lungul cromozomilor, nu a fost întocmit cariotipul la *C. elephantidens* şi *M. duwei.*

Tabelul 2

Lungimea cromozomilor în microni la unele specii de *Cactaceae*
(Chromosomes length, in microns, in some *Cactaceae* species)

Cromozomul (Chromosome)	*Coryphantha elephantidens*		*Mammillaria duwei*	
	in vivo	*in vitro*	*in vivo*	*in vitro*
I	3,20	4,00	3,00	4,00
II	2,55	2,75	2,40	3,25
III	2,10	2,50	2,15	3,00
IV	2,00	2,50	2,00	2,85
V	2,00	2,50	2,00	2,65
VI	2,00	2,30	2,00	2,50
VII	2,00	2,30	1,80	2,50
VIII	1,80	2,00	1,75	2,40
IX	1,65	1,75	1,60	2,25
X	1,50	1,60	1,25	2,00
XI	1,20	1,50	1,15	1,90

Scanned with OKEN Scanner

CONCLUZII

▼ Pentru evidenţierea cromozomilor la speciile din familia *Cactaceae,* se recomandă utilizarea celulelor în diviziune din perişorii radiculari.

▼ Cromozomii plantelor obţinute *in vitro* sunt mai lungi decât cei analizaţi la plantele *in vivo,* datorită probabil, unei compactări („împachetări") mai reduse a filamentelor de cromatină, determinată de existenţa unui echipament enzimatic mai redus în condiţiile culturii *in vitro.*

▼ Speciile analizate, *Coryphantha elephantidens, Lobivia incaica* şi *Mammillaria duwei* sunt diploide (2n = 22), având cromozomi mici (sub 4,00 μm lungime).

CYTOGENETICS STUDIES AT SOME *CACTACEAE* SPECIES AT *IN VIVO* AND *IN VITRO* CULTURE

SUMMARY

The somatic chromosomes number and some of their characteristics in *Cactaceae* species hawe been established, using as biological material radicel typs harvested from plants obtained from seeds native from the natural area (*Lobivia incaica,* Peru; *Mammillaria duwei,* Mexico) or its outside (*Coryphantha elephantidens),* or from *in vitro* obtained plants through somaclonal multiplications (*M. duwei* and *C. elephantidens*). By using the pluricellular radicular hairs and a Feulgen stain, the chromosomes from *Cactaceae* familiy can be easy studied. The analyzed specis are diploids (2n = 22). *In vitro* culture, the chromosomes are, in generally, longer compared with their length at the same species *in vivo* (*C. elephantidens, M duwei*), probably due to different degree of packing of chromatine filaments.

BIBLIOGRAFIE

Andersen E.F.,1962 – A revision of *Ariocarpus* (*Cactaceae*). II The status of the proposed genus *Neogomesia.* Amer. J. Bot., 49, 6, 1: 615–622.

Arecesmallea A.E., 1993 – *Leptocereus scopulophilus (Cactaceae),* a new species from Western Cuba. Brittonia, 45, 3: 226–230.

Blakely L.M. 1963 – Growth and variation of cultured plant cells. Ph. D. Thesis, Cornell University, thaca, New York.

Bolkhovskikh Z., Grieff V., Matvejeva T., Zakharjova V., 1969 – Chromosome numbers of flowering plants. Izd. Nauka, Leningrad.

Corneanu G.C., 1984 – Genetica *Cacteelor.* In Cactuşii (Edit. S. Copăcescu, B. Bobîrnac, V. Grigoraş). Ed. Scrisul Românesc, Craiova.

Corneanu G.C., Corneanu Mihaela, Bucurean A., 1991 – Plant regeneration in *Cactaceae* via callus through culture *in vitro* of non-fecundated ovules. In: *In vitro* Explant Cultures – present and perspectives (Ed. Dorina Cachiţă-Cosma), Cluj-Napoca: 43-44.

Corneanu G.C., 1992 – Obţinerea plantelor de *Parodia* sp. (*Cactaceae*). prin cultura *in vitro* a seminţelor. Analele Univ. Craiova, Biol. Agron. Hort., 23: 156–165.

Corneanu G.C. 1992 – The karyotype of *Lobivia incaica* Backbg. (*Cactaceae*). Congresul Naţional de Biologie „Emil Racoviţă", I: 148–149.

Corneanu Mihaela, Corneanu G.C., Copăcescu S.N., 1990 – Plant regeneration with somaclonal variability from *Mammillaria* sp callus, VIIth Intern. Congres of Plant Tissue and Cell Cultures, Abstract Book, Amsterdam: 95.

Corneanu Mihaela, Corneanu G.C., 1994 – *In vitro* culture of Cactaceae by different explant types. Lucrările celui de-al VIII–lea Simpozion Naţional de Microbiologie Industrială şi Biotehnologie (Ed. I. Anghel), Edit. Universităţii, Bucureşti: 443–445.

Scanned with OKEN Scanner

Diers L., 1961 – Der Anteil an Polyploiden in den Vegetation sgürteln der Westkordillere Perus. Zeitschr. f. Botan., 46, 5: 437–488.
Gallo L., 1986 – Genetica e piante succulente. Part. I. Piante Grasse, 6, 3: 89–93.
King M.R., 1957 – Studies on the tissue culture of *Cacti.* Cact & Succ. J. (US), 29: 102–104.
Krikorian A.D., O'Connor S.A., Fitter M.S., 1983 – Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and culture-derived plants. In: Handbook of Plant Cell Culture, I (Eds. D.A., Evans, W.R., Sharp, P.A. Ammirato, Yasuyuki Yamada), Macmilan Publ. Co., New York, London: 541–581.
Leuenberger B.E., 1992 – Interpretation and typification of *Cactus-ficus-indica* L. and *Opuntia ficus-indica* L. Miller (*Cactaceae).* Taxon, 40, 4: 621–627.
Leuenberger B.E., 1993 – Interpretation and typification of *Cactus opuntia* L., *Opuntia vulgaris* Mill. and *O. humifusa* (Rafin.) Rafin. (*Cactaceae*). Taxon, 42, 5: 419–429.
Mauseth J.D., 1993 – Medullary bundles and the evolution of *Cacti.* Amer. J. Bot., 80, 8: 928–932.
Mottram R., 1993 – Proposal to change conserved type of *Cactaceae*, nom. cons., and the entries of the conserved names *Mammillaria* and *Melocactus.* Taxon, 42, 5: 457–464.
Parker C. Kathleen, Hamrick J.L., 1992 – Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii.* Amer, J. Bot., 79, 1: 86–96.
Pizzetti Mariella, 1988 – Piante grasse le *Cactaceae.* Arnoldo Mondadori Editore, Verona.
Powell A.M., Zimmerman A.D., Hilsenbeck R.A., 1991 – Experimental documentation of natural hybridization in *Cactaceae* – Origin of Lloyd's Hedgeborg Cactus, *Echinocereus* x *Lloydii.* Plant Syst. & Evol., 178, 1–2: 107–122.
Sajeva M., Ferraino Silvana, 1966 – Colture *in vitro* delle *Cactaceae.* Piante Grasse, 6, 4: 105–115.
Siniscalchi R., 1991 – *Mammillaria duwei* Rog. et Braun. Piante Grasse, 11, 2: 86.
Straus J., 1954 – Maize endosperm tissue grown *in vitro.* II – Morphology and cytology. Amer. J. Bot., 41: 833–839.
Torrey J., 1959 – Experimental modification of development in the root. In: Cell, Organism and Milieu (Ed. D. Rudrick) Ronald Press, New York: 189–222.

Scanned with OKEN Scanner

CERCET. GENET. VEGET. ANIM., VOL. IV, 1996

UNELE REZULTATE PRIVIND CONSANGVINIZAREA LA CĂPŞUN (*FRAGARIA* x *ANANASSA* DUCH)

M. COMAN*

Este recunoscut faptul că depresiunea de consangvinizare apare şi în cazul autoalooctoploidului *Fragaria* x *ananassa* Duch. (2n = 8x = 56), la care, însă, obţinerea de generaţii consangvine mai îndepărtate de I_1 şi I_2 este dificilă. Au existat multe preocupări în direcţia obţinerii de linii consangvinizate la căpşun şi folosirii lor în diverse programe de ameliorare (Clark, 1938; Drain şi Fister, 1938; Jones şi Singleton, 1940; Anstey şi Wilcox, 1950; Baker, 1952; Alders şi Craig, 1964; Hulewicz şi Hortinsky, 1979; Niemirowicz-Szczytt, 1989). Majoritatea acestor autori au confirmat faptul că, în general, după primele două autofecundări viabilitatea plantelor scade considerabil, ceea ce determină dificultatea obţinerii descendenţilor şi că generaţiile I_1 şi I_2 au dovedit o variabilitate mare a unor caracteristici ca: vigoarea plantelor, mărimea fructelor, producţia de fructe, conţinutul în vitamina C, rezistenţa la boli etc. Sunt însă şi opinii diferite în ceea ce priveşte capacitatea de combinare a indivizilor din generaţiile I_1 şi I_2 . Astfel, Morrow şi Darrow (1952) şi Hulewicz şi Hortinsky (1979) consideră că unele selecţii din generaţiile I_1 şi I_2 pot depăşi, din puctul de vedere al producţiei de fructe, descendenţele obţinute în urma încrucişării între soiuri. Jones şi Singleton (1940) şi Lisiskin (1977) au avut însă păreri opuse cu privire la această problemă.

În general, programele de autopolenizare s-au desfăşurat pe un număr nelimitat de soiuri, rareori pornindu-se de la un număr iniţial de peste 10 soiuri (Hulewicz şi Hortinsky, 1979). Luând în considerare acest lucru şi faptul că în generaţiile I_1 şi I_2 au fost aleşi pentru încrucişări numai indivizii cei mai viguroşi, se poate concluziona că baza genetică a acestor experimentări a fost limitată.

O altă metodă în obţinerea liniilor consangvinizate la căpşun a fost aplicată de Niemirowicz-Szczytt (1987) şi constă în obţinerea de haploizi şi

* Institutul de Cercetare şi Producţie pentru Pomicultură, Piteşti-Mărăcineni

Scanned with OKEN Scanner

consangvinizarea lor la niveluri de ploidie reduse. În urma experimentărilor s-a observat o puternică depresiune consangvină şi o mare variabilitate a gameţilor la nivel de tetraploid.

În România, studii privind efectele consangvinizării şi încrucişării liniilor consangvinizate de căpşun s-au efectuat în perioada 1971–1975 de către A. Botar (nepublicat), acestea fiind reluate mai târziu de autorul lucrării de faţă.

Obiectivele cercetării au fost: determinarea unor diferenţe ale depresiunii de consangvinizare la soiurile de căpşun studiate, obţinerea unor indivizi viabili şi testarea acestora în diferite generaţii de consangvinizare.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

În vederea studierii depresiunii de consangvinizare la căpşun (*F.* x *ananassa* Duch.), în perioada 1982–990, au fost autofecundate şi urmărite în câmpul experimental al Institutului de Cercetare şi Producţie pentru Pomicultură Piteşti-Mărăcineni, un număr de 11 soiuri. Toate plantele cu flori obţinute în generaţiile I_1 şi I_2 s-au autopolenizat şi, apoi, în luna februarie, toate seminţele obţinute s-au semănat în seră. Plantele obţinute au fost repicate şi transferate în câmp, în luna mai, fiind plantate la distanţa de 1,00/0,50 m.

Au fost făcute observaţii şi determinări privind: capacitatea germinativă a seminţelor, producţia de fructe per plantă şi vigoarea descendenţilor consangvini, exprimată prin înălţimea şi diametrul plantelor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma primei autopolenzări efectuate la 11 soiuri de căpşun de origine diferită s-au obţinut 21 110 seminţe, din care au germinat doar 1 730, ceea ce reprezintă un procent de 8,2, considerat foarte redus. Soiul Aiko a înregistrat cel mai mare procent de răsărire (14,0) în timp ce cel mai redus procent a fost observat la soiurile Senga Sengana (1,2) şi Premial (3,4), (tabelul 1).

Procentul de plante ajunse la maturitate în câmpul de hibrizi a fost de asemenea foarte scăzut, media soiurilor fiind de 15,3, având limite cuprinse între 11,3 (Redgauntlet) şi 63,3 (Hood). Autofecundarea selecţiei americane NJ 2329–3 a dus în final la obţinerea celui mai mare număr de descendenţi (83 indivizi), în timp ce, în urma fecundării, la soiul Senga Sengana nu s-a obţinut nici o plantă viabilă în câmp (tabelul 1).

Capacitatea germinativă a seminţelor din generaţiile I_1 şi I_2 a avut aproximativ aceeaşi valoare medie (8,5%, respectiv, 8,7%), comparativ cu cea a seminţelor obţinute prin autopolenizarea soiurilor iniţiale (8,2%). În schimb, procentul de plante mature obţinut în generaţia I_2 (27,2) a fost aproape dublu faţă de procentul de plante mature obţinut în urma autofecundării soiurilor iniţiale (15,3) obţinându-se 403 plante mature în generaţia I_2, în comparaţie cu doar 265 plante obţinute în câmp în generaţia I_1 (tabelul 2).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Capacitatea de germinare a seminţelor şi numărul plantelor de căpşun viabile în generaţia I_1
(Seed germination after selfings of strawberry varities and number of S_1 mature plants)

Soiuri autofecundate (Outset varieties)	Numărul de seminţe obţinute (Seeds number)	Numărul de seminţe germinate (Germinated seeds)	Procentul de seminţe germinate (Germinated seeds), %	Numărul de plante mature în câmp (Mature plants in field)	Procentul de plante mature în câmp (Mature plants in field), %
Redgauntlet	2 500	150	6,0	17	11,3
Gorella	2 196	200	9,1	26	13,0
Muncheberger frühe	2 610	300	11,5	33	11,0
Fresno	910	35	3,8	4	11,4
Premial	590	20	3,4	10	50,0
Aiko	320	45	14,0	11	24,4
Hapil	4 910	400	8,1	51	12,7
NJ 2329–3	6 050	500	8,2	83	16,6
Earliglow	410	50	12,2	11	22,0
Hood	620	30	4,8	19	63,3
Senga Sengana	510	60	1,2	–	–
TOTAL	21 110	1 730	8,2	265	15,3

Tabelul 2

Capacitatea de germinare a seminţelor în generaţiile I_1, I_2 şi I_3 şi viabilitatea plantelor în generaţia I_2
(Strawberry seed germination ability în S_1, S_2 and S_3 and seedlings viability in S_2 generation)

Soiuri autofecundate (Outset varieties)	Numărul de plante cu seminţe (No. of plants with seeds)	I_1 (S_1)		%	I_2 (S_2)					I_3 (S_3)
		număr de: (no. of:)			plante mature (mature plants)		numărul de plante cu seminţe (no. of plants with seeds)	număr de: (no. of:)		
		seminţe (seeds)	plante răsărite (seedlings)		număr (no.)	procent (%)		seminţe (seeds)	plante răsărite (seedlings)	%
Redgauntlet	6	470	105	22,3	58	55,2	26	1 600	96	6,0
Gorella	9	1 100	119	10,8	35	29,4	13	910	52	5,7
Muncheberger frühe	11	4 300	405	9,4	106	26,2	19	2 050	218	10,6
Fresno	1	280	31	11,0	9	29,0	3	209	79	37,8
Premial	4	370	59	15,9	11	18,6	5	660	21	3,2
Aiko	3	340	12	3,5	6	50,0	2	122	12	9,8
Hapil	16	4 050	181	4,5	51	28,1	11	817	81	9,9
NJ 2329–3	19	5 320	512	9,6	98	19,1	15	1 030	62	6,0
Earliglow	2	320	16	5,0	10	62,5	3	242	41	16,9
Hood	3	720	39	5,4	19	48,7	3	161	12	7,4
TOTAL	74	17 270	1 479	8,5	403	27,2	100	7 801	672	8,7

Scanned with OKEN Scanner

Deşi procentul de seminţe germinate în generaţiile I_2 şi I_3 a fost apropiat ca valoare de cel din generaţia I_1 şi deşi numărul de plante viabile a fost mai mare în generaţiile I_2 şi I_3 faţă de I_1, totuşi, procentul de genotipuri iniţiale I_1 a fost substanţial redus de la 21,9 la 11,3 (tabelul 3).

Soiurile NJ 2329–3 şi Hapil au avut cel mai mare număr de genotipuri care au participat la obţinerea generaţiei I_3.

Producţia medie per plantă, în generaţia I_2, a fost mult mai mică faţă de cea a soiului martor Redgauntlet. Aceeaşi tendinţă a fost observată şi în generaţia I_1 (tabelul 4).

De asemenea, numărul plantelor neroditoare a crescut în generaţia a doua de consangvinizare (97 indivizi), faţă de generaţia întâi (25 indivizi). În ce priveşte producţia de fructe per plantă, s-a înregistrat o puternică variabilitate cu limite mari de producţie pentru fiecare soi în parte. Cele mai multe plante au produs fructe mici, deformate, fasciate, plantele având în general o vigoare mai mică şi cu creştere mai compactă decât soiul iniţial (tabelul 4).

Valorile medii ale înălţimii plantelor de căpşun sunt mai concludente decât cele ale diametrelor. Astfel, faţă de media înălţimii materialului iniţial (26,1 cm), în generaţia I_2 s-a înregistrat o valoare medie de numai 14,5 cm (tabelul 5). Dintre soiurile care au dovedit o depresiune mare de consangvinizare au fost: Gorella, Earliglow şi Munchenberger Frühe.

Tabelul 3

Genotipuri iniţiale I_1 prezente ca linii în generaţiile I_2 şi I_3
(Initial S_1 genotypes present as lines in S_2 and S_3)

Soiuri autofecundate (Outset varities)	Număr de plante I_1 (No. of S_1 plants)			Număr de linii I_2 fertile I_2/I_3 (No. of fertile S_2 lines S_2/S_3)	Procentul liniilor I_2 faţă de generaţia I_1 (S_2 lines as compared to total S_1) %
	total (total)	fertile I_1/I_2 (fertile S_1/S_2)	%		
Redgauntlet	17	6	35,3	3	17,6
GoreIla	26	6	23,6	3	11,5
Muncheberger frühe	33	7	21,2	3	9,1
Fresno	4	1	25,4	1	25,0
Premial	10	6	60,0	4	40,0
Aiko	11	4	36,4	1	9,1
Hapil	51	9	17,6	5	9,8
NJ 2329–3	83	14	16,8	8	9,4
Earliglow	11	2	18,2	1	9,1
Hood	19	3	15,8	1	5,3
TOTAL	265	54	21,9	30	11,3

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4

Numărul de plante neroditoare în generaţiile I_1 şi I_2. Producţia medie de fructe în generaţia I_2
(Number of non-yielding plants in S_1 and S_2 generations. Fruits yield per plant in S_2 generation)

Soiuri autofecundate (Outset varieties)	Plante I_1 (S_1 plants)		Plante I_2 (S_2 plants)		Producţia per plantă (Yield per plant), g	Limite (Limits), g
	total (total)	fără rod (non-yielding)	total (total)	fără rod (non-yielding)		
Redgauntlet	17	0	58	20	180	78–410
Gorella	36	3	38	9	183	30–420
Muncheberger frühe	33	0	106	18	250	11–456
Fresno	4	0	9	3	198	15–407
Premial	10	0	11	1	110	18–415
Aiko	11	0	6	1	190	41–318
Hapil	62	4	55	18	90	5–450
NJ 2329–3	102	18	116	21	152	37–280
Earliglow	11	0	10	3	112	15–280
Hood	19	0	19	3	184	64–390
TOTAL	305	25	428	97	1649	–
Martor Redgauntlet (clonă)					385	314–496

Tabelul 5

Vigoarea plantelor obţinute în generaţia I_2 (valori medii)
(Plants vigour in S_2 generation)

Soiuri autofecundate (Outset varieties)	Soiuri iniţiale (Initial varieties)			I_2 (S_2)	
	înălţimea plantelor (plants height), cm	diametrul plantelor (plants diameter), cm	număr de plante (no. of plants)	înălţimea plantelor (plants height), cm	diametrul plantelor (plants diameter), cm
Redgauntlet	24	29	58	14	27
Gorella	28	32	38	12	33
Muncheberger frühe	27	46	106	10	29
Fresno	22	41	9	18	30
Premial	23	42	11	22	41
Aiko	21	39	6	12	34
Hapil	29	36	55	16	32
NJ 2329-3	30	36	116	13	29
Earliglow	19	35	10	10	30
Hood	31	39	19	18	37
Media:	26,1	35,2	428	14,5	32,2

Scanned with OKEN Scanner

CONCLUZII

▼ Rezultatele obţinute în urma experimentărilor efectuate la Institutul de Cercetare şi Producţie pentru Pomicultură Piteşti – Mărăcineni confirmă opinia majorităţii autorilor citaţi în lucrare şi anume că, în urma autofecundării unor soiuri din specia de căpşun *Fragaria* x *ananassa* Duch. se înregistrează o depresiune de consangvinizare puternică, observată până în generaţiile I_2 şi I_3.

▼ Procentul de germinare a seminţelor în generaţia I_2 a fost cu puţin mai mic faţă de cel din generaţia I_1, în timp ce procentul de plante mature obţinute în I_2 a fost cu mult mai ridicat comparativ cu procentul de plante mature obţinut în generaraţia I_1.

▼ Dintre cele 10 soiuri care au produs descendenţi în generaţiile I_1 şi I_2 (excepţie soiul Senga Sengana care nu a produs plante viabile în generaţia I_1) se remarcă selecţia NJ 2329-3 şi soiul Hapil, care au produs cel mai mare număr de linii fertile în generaţiile I_2 şi I_3. Acest lucru poate fi explicat prin reducerea numărului de factori letali la nivelul acestor genotipuri.

▼ Atât producţia de fructe, cât şi înălţimea plantelor au înregistrat valori medii mult mai reduse în generaţia I_2 faţă de materialul iniţial. Practic, în generaţiile I_1 şi I_2 nu s-a identificat nici un individ comparabil (din punct de vedere al celor două caracteristici) cu soiul martor.

SOME RESULTS FROM INBREEDING IN STRAWBERRY (*FRAGARIA x ANANASSA* DUCH)

SUMMARY

In order to screen the inbreeding depression and for obtaining some imbred lines of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.), 11 cultivars have self-pollinated, but only 10 developed S_2 and S_3 generations.

The percentage of seeds germination in the 2nd generation was slightly lower versus the 1st generation, nevertheless the percentage of mature plants in S_2 has been much higher.

Of the ten cultivars with inbred progenies in S_1 and S_2 generations (except Senga Sengana cv.), NJ 2329-3 selection and Hapil cv. gave the greatest number of fertile lines.

Both the fruits yield and plant height have been shown average values much lower in the 2nd generation versus the initial plants. Practically, in S_1 and S_2 generations none of the progenies had the same features with the control cultivar, Redgauntlet, However, many differences among seedlings, as regards fruit yield, were recorded.

BIBLIOGRAFIE

Aalders L.E., Craig D.L., 1964 – The inbred line F_1 hibrid approach to strawberry breeding as practiced at Kentville. Canad. J. Gen. Cyt. 6: 237.

Anstay T.H., Wilcox A.N., 1950 – The breeding value of selected inbred clones of strawberries with respect to their vitamin C content. Scient. Agr. 30: 367–374.

Baker R.E., 1952 – Inheritance of fruit characters in the strawberry: a study of several F_1 hybrid and inbred populations. J. Hered. 43: 9–14.

Clark J.H., 1938 – Inheritance of the so-called everbearing tendency in the strawberry. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 35: 67–70.

Scanned with OKEN Scanner

Drain B.D., Fister L.A., 1938 – Some strawberry breeding progeny data. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 35: 60–66.
Hulewicz I, Hortynski J.A.,, 1979 – Effect of inbreeding and its use in strawberry breeding. Genet. Polonica 20, 4: 541–457.
Jones D.L., Singleton W.R., 1940 – The improvement of naturally cross pollinated plants by selection of selffertilized lines. Bull. Conn. Agr. Exp. Sta. 435: 325–347.
Lisiskin A.M., 1977 – Study of test crosses and selfings in breeding strawberry. From Ref Zhurnal. 5 : 65, 624.
Morrow E.B., Darrow G.M., 1952 – Effects of limited inbreeding. in strawberries. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 59: 269–276.
Niemirowicz – Szczytt K., 1987 – Strawberry / *Fragaria* x *ananassa* Duch./ haploids and their generative progeny. Induction and characteristics. Warshaw Agr. Univ. Press. SGGW – AR: 1–64.
Niemirowicz – Szczytt K., 1989 – Preliminary studies on inbreeding in strawberry *Fragaria* x *ananassa* Duch. Acta Hort. 265: 97–104.

Scanned with OKEN Scanner

ASPECTE BIOCHIMICE ALE ÎNSUȘIRII DE REZISTENȚĂ A MĂRULUI LA RAPĂN

MARIA RĂDULESCU, N. BRANIȘTE*

Obținerea de soiuri și hibrizi rezistenți la boli reprezintă principalul mijloc de perspectivă pentru diminuarea pagubelor produse de boli în plantații și de reducere a costurilor de producție prin micșorarea numărului de tratamente cu fungicide specifice, cunoscându-se că cel mai ieftin și bun mijloc de combatere este rezistența genetică.

Cunoașterea factorilor genetici sau negenetici, precum și de altă natură, care participă la realizarea rezistenței sau sensibilității la boli, în general, constituie contribuții de seamă la progresul științei.

În acest context, stabilirea rolului acțiunii diferitelor substanțe din planta gazdă are o importanță deosebită.

Lucrările efectuate pe această temă până în prezent citează numeroase grupe de substanțe care intervin în interacțiunea agent patogen-plantă gazdă (fenoli, proteine, fermenți, substanțe tanoide, elemente minerale, pigmenți flavonoidici) (Friend, 1976; Ingham, 1973; Johnson et al., 1976; Kuc, 1976; Neamțu, 1983; Swinburne, 1973; Towers, 1964). Totodată este amintit și rolul unor factori ai mediului ambiant care influențează rezistența sau sensibilitatea.

S-a constatat că plantele au capacitatea de a-și forma o barieră chimică cu ajutorul căreia se opun pătrunderii, creșterii și dezvoltării agenților patogeni în corpul lor. Compușii care alcătuiesc bariera chimică se formează o dată cu creșterea și dezvoltarea plantelor înaintea infestării lor – compușii preinfecționali – cât și după infectarea plantelor – compușii postinfecționali.

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

S-a luat în studiu materialul biologic a cărui rezistență la boli este cunoscută și anume: genotipuri cu rezistență de tip vertical și orizontal cum sunt: Florina, Prima, Priam Liberty, Nova Easygro, Sir Prize, Pionier, Voinea, Generos,Romus 1,

* Institutul de Cercetări pentru Producție și Pomicultură, Pitești – Mărăcineni.

Scanned with OKEN Scanner

Romus 2, Romus 3 şi genotipurile sensibile: Jonathan, Golden Delicious, Starkrimson, Idared, Nured, Mutsu.

Ca material de lucru s-au folosit frunze sănătoase recoltate în anumite momente (lunile iunie, iulie şi august) din cursul perioadei de vegetaţie în anii 1991 şi 1992.

La materialul vegetal proaspăt s-a determinat activitatea peroxidazei şi conţinutul în substanţe tanoide, iar la materialul vegetal conservat, prin lichid cromatografie de înaltă presiune (HPLC), compuşi fenolici.

Metodele folosite au vizat:

a) extracţia peroxidazei cu soluţia tampon acetat cu pH = 4,7. Oxidarea acidului ascorbic în dehidroascorbic şi titrarea acidului rămas neoxidat; activitatea se exprimă în ml I_2 0,01 n;

b) determinarea taninurilor prin metoda Lowenthal-Neubeur; conţinutul se exprimă în g%;

c) extracţia substanţelor fenolice cu acetat de etil după o refluxare cu HCl; identificarea se face prin lichid cromatografic de înaltă presiune (HPLC) folosind o coloană C_{18}, lungimea de undă λ = 254 nm şi ca fază mobilă amestecul: apă, acetonitril; acid acetic (88 : 10 : 2); rezultatele se exprimă în arie % şi arie a maximelor obţinute.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conţinutul în **proteine enzimatice** (peroxidaza) cu rol în descompunerea pereţilor celulari ai miceliilor ciupercii şi în catalizarea reacţiilor de sinteză a fitoalexinelor şi altor compuşi fenolici ca inhibitori ai procesului infecţios se găseşte în cantitate mai mare la soiurile rezistente.

Activitatea peroxidazei a oscilat între 0,05–0,30 ml I_2 0,01 n în 1991 şi 0,05–0,35 ml I_2, 0,01 n în 1992 şi se observă, în general, o scădere a activităţii în cursul perioadei de vegetaţie.

O activitate peroxidazică medie ridicată, în strânsă legătură cu rezistenţa s-a observat la soiurile Romus 1, Romus 2, Romus 3, Prima, Florina, Pionier (fig. 1 a).

Deşi fac parte din grupa soiurilor rezistente, soiurile Priam, Sir, Prize, Liberty, Nova Easygro şi Generos au evidenţiat o activitate peroxidazică mai scăzută, care este compensată printr-un conţinut mai ridicat în substanţe tanoide.

Din grupa soiurilor sensibile, soiul Idared se remarcă printr-o activitate peroxidazică ridicată în ambii ani, însă această activitate nu este sprijinită de un conţinut ridicat în substanţe tanoide pentru a-i conferi rezistenţă genetică controlată.

Datele privitoare la conţinutul în **substanţe tanoide** confirmă faptul că acestea se află în cantitate mai mare la soiurile rezistente comparativ cu cele sensibile şi oscilează între 0,140–0,770 g% în 1991 şi 0,228–0,732 g% în 1992.

Se observă un conţinut scăzut în substanţe tanoide la întreaga grupă de soiuri sensibile faţă de cele rezistente (fig. 1 b).

Scanned with OKEN Scanner

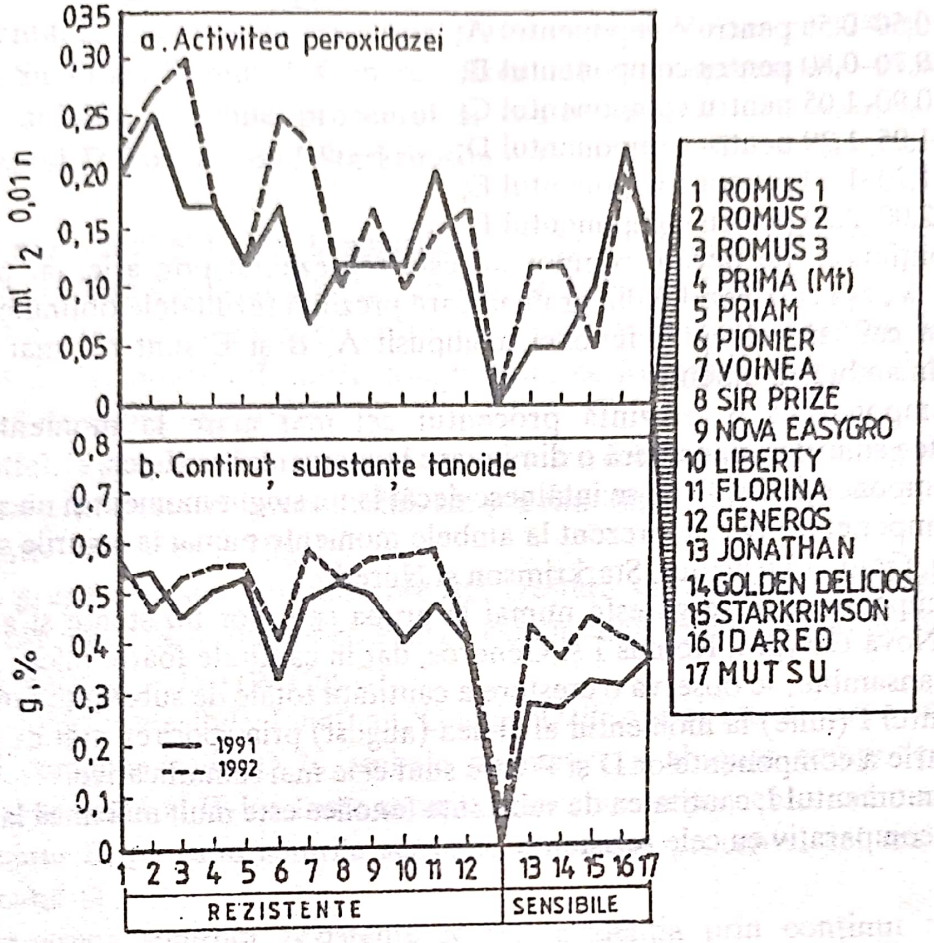


Fig. 1 – Activitatea peroxidazei și conținutul în substanțe tanoide
(The peroxidaze activity and the content in tannoidic substances)

Se remarcă, prin conținutul ridicat în substanțe tanoide peste medie în strânsă legătură cu rezistența la rapăn, soiurile: Florina, Prima, Liberty, Nova Easygro, Sir Prize, Voinea, Romus 1, Romus 2, Romus 3.

Soiurile la care o activitate sporită a peroxidazei se completează cu un conținut ridicat în substanțe tanoide prezintă o rezistență certă la rapăn. Se confirmă astfel rezultatele obținute anterior și anume că, în frunzele de măr activitatea peroxidazei și conținutul în substanțe tanoide este mai mare la genotipurile rezistente, comparativ cu cele sensibile.

Pentru prima dată în cercetările biochimice din pomicultură la noi în țară, prin lichid cromatografie de înaltă presiune (HPLC), s-au determinat **compușii fenolici** din materialul vegetal conservat. Aceștia constituie o barieră în pătrunderea și înmulțirea agenților patogeni în organismul vegetal.

Analizele efectuate au evidențiat prezența a șase maxime corespunzătoare a șase tipuri de substanțe fenolice, notate cu literele de la A la F, în funcție de timpul de retenție (RT) exprimat în minute.

Scanned with OKEN Scanner

Timpii de retenţie corespunzători fiecărui component sunt:

- 0,50–0,55 pentru componentul A;
- 0,70–0,80 pentru componentul B;
- 0,90–1,05 pentru componentul C;
- 1,05–1,20 pentru componentul D;
- 1,20–1,30 pentru componentul E;
- 2,00–2,20 pentru componentul F.

Conţinutul din fiecare component este reprezentat prin arie, iar procentul prin arie %, aşa cum rezultă din graficul care prezintă rezultatele obţinute.

Din cei şase compuşi fenolici, compuşii A, B şi E sunt cel mai frecvent întâlniţi în ambele momente.

Componentul A prezintă procentul cel mai mare la momentul I, la majoritatea soiurilor, dar suferă o diminuare la momentul al II–lea.

Componenţii C şi D nu se întâlnesc decât la un singur moment şi nu simultan.

Componentul D este prezent la ambele momente numai la soiurile sensibile: Jonathan, Golden Delicious, Starkrimson şi Nured.

Componentul F se găseşte numai la grupa soiurilor rezistente şi anume la soiurile: Nova Easygro, Romus 1 şi Generos, dar în cantitate foarte mică.

Pe ansamblu, se observă o creştere a cantităţii totale de substanţe fenolice de la momentul I (iulie) la momentul al II–lea (august) prin sporirea atât ca procent, cât şi ca arie a componentelor D şi E care sunt cele mai semnificative.

La momentul I, cantitatea de substanţe fenolice este mult mai mică la soiurile sensibile comparativ cu cele rezistente.

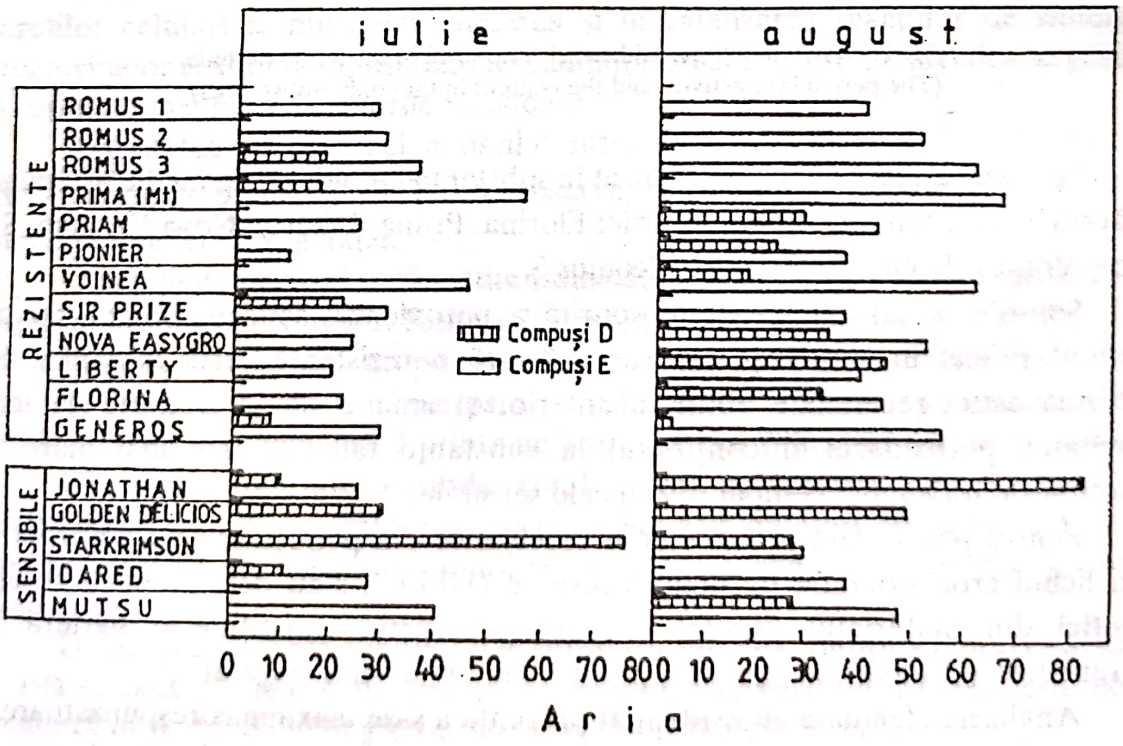


Fig. 2 – Conţinutul în substanţe fenolice în lunile iulie şi august
(The content in phenolic substances in July and August months)

La soiurile rezistente procentul şi cantitatea cea mai mare o prezintă componentul E remarcându-se soiurile: Prima cu 57%, Voinea cu 47% şi Romus 3 cu 37%, Sir Prize, Romus 2, Generos, Romus 1 – cu aproximativ 30% (fig. 2).

La soiurile sensibile procentul şi cantitatea cea mai mare o prezintă componentul D care la soiul Starkrimson este de 79%, iar la Golden Delicious de 30%.

La momentul al II–lea, la soiurile sensibile Jonathan şi Golden Delicious se observă o creştere a conţinutului în substanţe fenolice de trei ori.

Tot de trei ori a crescut şi conţinutul în substanţe fenolice la soiurile Pionier şi Romus 2, dar procentul dintre componenţii ce formează conţinutul total este diferit faţă de soiurile sensibile.

Astfel, la grupa soiurilor rezistente creşterea conţinutului de compuşi fenolici s-a realizat prin creşterea procentului, cât şi a cantităţii componentului E care este cuprins între 35% şi 64% (fig. 2).

La grupa soiurilor sensibile această creştere se datorează creşterii atât ca procent, cât şi ca arie a componentului D, care la soiul Jonathan ajunge 79%, iar la Golden Delicious – la 47% (fig. 2).

La soiurile sensibile Jonathan, Golden Delicious şi Starkrimson se observă prezenţa componentului D în ambele momente, şi absenţa componentului E.

În momentul al II–lea toate soiurile rezistente au procentul cel mai mare în componentul E, pe când soiurile sensibile realizează procentul cel mai mare în componentul D.

Din grupa soiurilor rezistente se pot evidenţia prin conţinut ridicat în componentul E la ambele momente soiurile: Prima, Sir Prize, Voinea, Romus 1, Romus 2, Romus 3.

Deci compuşii fenolici şi derivaţii lor, care sunt compuşii cel mai bine reprezentaţi între substanţele ce contribuie la formarea barierei chimice primare, determină rezistenţa sau sensibilitatea nu numai prin conţinutul total, ci şi prin tipul acestora. Astfel, soiurile rezistente au procentul cel mai mare în componentul E, iar soiurile sensibile în componentul D.

CONCLUZII

▼ Cercetările efectuate confirmă rezultatele obţinute anterior, şi anume, că în frunzele de măr activitatea peroxidazei şi conţinutul în substanţe tanoide este mai mare la genotipurile rezistente comparativ cu cele sensibile la rapăn.

▼ Rezistenţa sau sensibilitatea unor soiuri de măr la rapăn este influenţată nu numai prin conţinutul total în compuşi fenolici, ci şi prin tipul acestora.

▼ Grupele de substanţe analizate se pot constitui în indicatori de diagnosticare biochimică a infecţiilor de rapăn şi se pot folosi în procesul de selecţie timpurie pentru trierea materialului obţinut în ameliorare.

Scanned with OKEN Scanner

BIOCHEMICAL ASPECT OF RESISTANCE CHARACTERISTICS TO SCAB, IN THE APPLE TREE

SUMMARY

The researches carried out at Research and Production Institute for Fruit Growing Piteşti-Mărăcineni were initiated aiming to identify the chemical compounds with antiinfection qualities, as biochemical base of resistance characteristics to scab in apple tree, to be used in biochemical diagnostic of the infections and in breeding and selection process of varieties. It has been studied the resistent genotypes Florina, Prima, Priam, Liberty, Nova Easygro, Sir Prise, Pionier, Voinea, Generos, Remus 1, Remus 2, Remus 3 and sensible genotypes: Jonathan, Golden Delicios, Starkrimson, Idared, Nured, Mutsu, Gala. There are used healthy leaves harvested in the different time (in June, July, August) during the vegetation period in 1991–1992.

For the first time in our country, in biochemical researches in fruit growing in was used high pressure liquid chromatography (HPLC) and have been determined phenolic compounds.

On the fresh vegetable preserved material, the peroxidaze activity and the content of tannoidic substances have been analized.

The researches performed, indicated that the percentage and quality of the six phenolic types which have been identified according to retention type (RT) correlated with the resistance of the apple tree to scab. Also, have been confirmed the results earlier obtained and which showed that in apple tree leaves the peroxidaze activity and the content in tannoidic substances are higher in resistent types.

These groups of substances might become the indicators in biochemical diagnoses of the infections in early breeding process for selection of the obtained material.

BIBLIOGRAFIE

Friend J., Threlfall D.R. 1976 – Biochemical aspects of plant-parasite relationships, Acad. press, Londra: 354.

Ingham I.L., 1973 – Phytopath. Z., 78: 314–335.

Ingham I.L., 1976 – Phytochemistry, 15: 1791–1793.

Johnson G., Maag D.D., Johnson D.K., Thomas R.D., 1976 – Physiol. Plant Path., 8: 225–230.

Kuc J.A. 1976 – Phytoalexins. Physiological Plant Pathology, Berlin: 632–635.

Neamţu G., 1983 – Biochimia rezistenţei plantelor la boli infecţioase. Biochimia Ecologică: 119–143.

Swinburne T.R., 1973 – Fungal pathogenecity and the plants response. Acad. press, London: 365.

Towers G.H.N., 1964 – Biochemistry of phenolic compounds. Acad. press, London: 249.

Scanned with OKEN Scanner

CERCETĂRI PRIVIND VARIABILITATEA UNOR CARACTERE LA DESCENDENȚII PRUNULUI OTEȘANI 8

I. BOTU, ELENA TURCU, GH. ACHIM, M. BOTU *

Sporirea variabilității materialului biologic și fixarea lui în cadrul genului *Prunus* constituie calea sigură pentru realizarea unui progres genetic intens și rapid.

În prezentul studiu s-a lucrat cu genotipul Oteșani 8 (o selecție dintr-o populație autohtonă de prun din Vâlcea), pentru caracteristicile importante pe care le prezintă: vigoare redusă (de tip semidwarf), adaptabilitate ridicată la solurile argiloase, compatibilitate la altoire etc. Transmiterea în descendență a caracterelor: expresia fenotipului, vigoarea de creștere, prezența dragonilor, a spinilor, tipul de fructificare constituie obiective majore ale programului de ameliorare a portaltoilor pentru prun.

Variabilitatea ridicată în descendență a acestor caractere oferă posibilități superioare în realizarea unui screening cât mai valoros al genotipurilor.

În acest sens ne-am propus să stabilim în ce măsură prunul Oteșani 8 poate contribui la sporirea variabilității, în direcția creării de noi portaltoi pentru prun.

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

Materialul inițial utilizat în prezenta lucrare este constituit din genitorii: Oteșani 8 (plantația mamă), unele specii de *Prunus* (*P. besseyi; P. spinosa*) și hibrizii interspecifici (*P. besseyi* x Gogoșele galbene etc.).

Variabilitatea unor caractere s-a urmărit atât în combinațiile hibride (F_1), la care Oteșani 8 a servit ca mamă (7 combinații hibride intra și interspecifice), cât și în autofecundările (C_1) și mutanții V_1 și V_2 obținuți prin iradiere cu C_0^{60}, la doza de 3 000–5 000 rads.

Măsurătorile și determinările s-au executat pe hibrizii F_1 și mutanții V_2 în vârstă de 5–6 ani, considerând că aceste caractere sunt bine exprimate în această etapă la câmpurile de selecție.

* Stațiunea de Cercetare și Producție Pomicolă, Vâlcea

Scanned with OKEN Scanner

De asemenea, s-a determinat echilibrul genetic al descendenţilor populaţiei de Oteşani 8 (autofecundare) cu ajutorul testului X^2.

Studiul variabilităţii caracterelor s-a efectuat cu ajutorul analizei varianţei (S^2), abaterii standard (S) şi a coeficientului de variaţie (S%).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din studiul descendenţilor (tabelul 1) rezultă că suprafaţa secţiunii trunchiului (element determinant în stabilirea vigorii de creştere) ca valoare medie pe familii de descendenţi este cuprinsă între 17,0 cm^2 (Oteşani 8 x *P. besseyi*) şi 70,0 cm^2 (Oteşani 8 x Blue free).

Tabelul 1

Determinarea abaterii standard (s) şi a coeficientului de variaţie (s %) la populaţiile de hibrizi şi mutanţi F_1 şi V_2 pentru caracterul „aria secţiunii trunchiului"
(Determination of the standard deviation (s) and of the variation coefficient (s %) in hybrid populations and mutants F_1 and V_2 for „area of trunk section")

Nr. crt. (No.)	Combinaţia hibridă (Hybrid combination)	Număr descendenţi (Number of progenies)	A.S.T. X_{mediu} (Area of trunk section, $X_{average}$), cm^2	Amplitudinea variaţiei (Variation amplitudine), cm^2	s^2	s	s %
1	Oteşani 8 x *P. besseyi*	24	17,0	4,4 – 54,7	28,46	5,33	31,3
2	Oteşani 8 x (*P. besseyi* x americana)	17	19,5	6,4 – 35,1	5,83	2,41	12,3
3	Oteşani 8 x *P. spinosa*	12	37,5	20,4 – 45,9	25,0	5,0	13,3
4	Oteşani 8 x Silvia	12	55,0	17,9 – 71,7	35,0	5,92	10,7
5	Oteşani 8 x Renclod verde	24	41,0	6,4 – 127,4	128,3	11,32	27,6
6	Oteşani 8 x Blue Free	50	70,0	8,0 – 115,0	276,4	16,62	23,7
7	Oteşani 8 x Gogoşele galbene	21	38,6	8,0 – 67,0	48,5	6,91	17,8
8	Oteşani 8 x Oteşani 8	49	21,0	3,9 – 38,5	30,8	5,55	26,4
9	Oteşani 8 – iradiat (V_2)	147	37,4	5,1 – 109,0	18,4	4,29	11,5
	Media	356	37,5	3,9 – 127,4	–	–	–

Comparativ cu media tuturor descendenţilor (37,5 cm^2) rezultă că descendenţii obţinuţi din Oteşani 8 cu *P. besseyi* şi *P.* (*besseyi* x americana), precum şi cei rezultaţi din autopolenizare, realizează o suprafaţă a secţiunii trunchiului cu mult mai redusă. Acest lucru este explicabil deoarece atât *P. besseyi* cât şi hibrizii P. (*besseyi* x americana) prezintă o vigoare de tip dwarf.

De asemenea, la autopolenizarea lui Oteşani 8 s-a produs o reducere simţitoare a vigorii de creştere.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul materialului iradiat de Oteşani 8 s-a constatat că în generaţia V_2, valoarea medie a descendenţilor este la nivelul mediei tuturor descendenţilor.

Atunci când s-au folosit ca genitori paterni soiuri mai viguroase s-au obţinut valori mai ridicate la acest element (Silvia – 55,0 cm²; Blue free – 70,0 cm² etc).

Ca şi în cazul altor combinaţii hibride efectuate la Staţiunea Vâlcea, vigoarea mare de creştere este un caracter dominant, iar vigoarea redusă un caracter recesiv. Determinismul acestui caracter este complex, dar din combinaţiile realizate devine evident că variabilitatea poate fi sporită, fie în sensul reducerii ei până la nivelul de dwarf, fie la creşterea ei până la nivelul de foarte mare.

Când folosim genitorul Oteşani 8 în combinaţie cu genitorii tip dwarf (*P. besseyi; P.* (*besseyi* x americana), variabilitatea acestui element (S%) este cuprinsă între 31,3 şi 13,3% la nivelul unei valori medii reduse, ceea ce determină ca peste 87% şi respectiv 29% din descendenţi să se înscrie în clasa I de vigoare (dwarf), (tabelul 2). În aceste combinaţii nu se întâlnesc descendenţi de vigoare medie sau mare.

Tabelul 2

Vigoarea descendenţilor la câteva combinaţii hibride şi la mutanţii din portaltoiul Oteşani 8 (♀), după valoarea ariei secţiunii trunchiului

(Vigour of progenies in some hybrid combinations and in mutants of rootstock Oteşani 8 (♀) depending on the area of trunk section)

Nr. crt. (No.)	Combinaţia hibridă (Hybrid combination)	Vigoarea plantei după aria secţiunii trunchiului (Plant vigour depending on the area of trunk section)						
		Număr descendenţi (number of progenies)	A.S.T. $X_{med.}$ (A.F.S. $X_{average}$), cm²	Clasa I nr. /% (I category, no. /%)	Clasa II nr. /% (II category, no. /%)	Clasa III nr. /% (III category, no. /%)	Clasa IV nr. /% (IV category, no. /%)	Clasa V nr. /% (V category, no. /%)
1	Oteşani 8 x *P. besseyi*	24	17,0	21/87	1/5	2/8	–	–
2	Oteşani 8 x (*P. besseyi* x americana)	17	19,5	5/29	12/71	–	–	–
3	Oteşani 8 x *P. spinosa*	12	37,5	–	12/100	–	–	–
4	Oteşani 8 x Silvia	12	55,0	–	–	6/50	6/50	–
5	Oteşani 8 x Renclod verde	24	41,0	4/16	4/17	4/17	12/50	–
6	Oteşani 8 x Blue Free	50	70,0	1/3	14/27	29/57	6/13	–
7	Oteşani 8 x Gogoşele galbene	21	38,6	12/55	9/45	–	–	–
8	Oteşani 8 x Oteşani 8	49	21,0	26/54	23/46	–	–	–
9	Oteşani 8 – iradiat (V_2)	147	37,4	29/20	87/59	30/20	11/1	–
		356	37,5	98/28	162/46	71/20	25/6	–

Clasa I	Dwarf,	R = 2,5 cm AST	20 cm² = 4 puncte	(1 punct = 5 cm²)
Clasa II	Semidwarf,	R = 4,0 cm AST	50 cm² = 10 puncte	
Clasa III	Mică,	R = 6,0 cm AST	115 cm² = 23 puncte	
Clasa IV	Medie,	R = 8,0 cm AST	200 cm² = 40 puncte	
Clasa V	Mare,	R = 8,0 cm AST	200 cm² = 40 puncte	

Scanned with OKEN Scanner

În combinaţiile Oteşani 8 cu *P. spinosa* (vigoare medie) şi Gogoşele galbene (semidwarf – medie), coeficientul de variabilitate este de 13,3% şi respectiv 17,8%, dar descendenţii se înscriu în majoritatea lor în clasa a II-a sau semidarf (100%–45%).

Coeficientul de variabilitate în celelalte combinaţii este de 10,7% (Silvia) până la 27,6% (Renclod verde), dar în aceste cazuri descendenţii se înscriu preponderent în clasele de vigoare III şi IV şi numai sporadic în clasele II şi I.

La mutaţii V_2 (iradiere), limitele de variaţie sunt foarte largi (5,1–109,0 cm²), iar coeficientul de variabilitate de 11,5%. Mutanţii se încadrează în procent de 46 în clasa de vigoare II, 28 în clasa I, 20 în clasa III şi numai 6 în clasa IV. Din această prezentare rezultă că şi prin mutageneză poate spori variabilitatea materialului provenit din Oteşani 8.

În clasa de vigoare V nu s-a încadrat nici un descendent din aceste combinaţii. Aceasta poate fi pusă pe seama vârstei relativ mici a plantelor (5–6 ani). Clasele de vigoare după aria secţiunii trunchiului sunt alcătuite în funcţie de valoarea acestui element pentru plante la vârsta de peste 10 ani.

În evoluţia lor descendenţii pot trece la o clasă de vigoare superioară ca urmare a acumulărilor anuale în grosime a trunchiului.

Prezenţa drajonilor la un portaltoi este un caracter negativ.

În cazul portaltoiului Oteşani 8 se constată că emite un număr relativ mare de drajoni. Descendenţii obţinuţi din combinaţiile hibride cu Oteşani 8, ca mamă, se prezintă cu un procent redus ca şi capacitate de drajonare (8–37%) (tabelul 3).

În toate combinaţiile majoritatea descendenţilor nu au emis drajoni (67–92%). Determinismul acestui caracter nu poate fi stabilit cu precizie decât la o vârstă de 9–12 ani a plantelor deoarece abia atunci începe să se manifeste cu intensitate mare.

Tabelul 3

Raportul de transmitere la descendenţi ale unor caractere principale, la folosirea portaltoiului Oteşani 8 ca genitor matern

(Transfer of the main characters to the progenies using the rootstock Oteşani 8 as a maternal genitor)

Nr. crt. (No.)	Combinaţia hibridă (Hybrid combination)	Total descendenţi (Whole progenies)	Prezenţa drajonilor (Existence of soboles)				Prezenţa spinilor (Existence of spicules)				Tipul de fructificare (Fructification type)			
			da		nu		da		nu		spur		standard	
			nr. (no.)	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%
1	Oteşani 8 x *P. besseyi*	24	1	4	23	96	5	21	19	79	24	100	–	–
2	Oteşani 8 x (*P. besseyi* x americana)	17	2	12	15	88	8	47	9	53	17	100	–	–
3	Oteşani 8 x *P. spinosa*	12	2	17	10	83	10	83	2	17	9	75	3	25
4	Oteşani 8 x Silvia	12	1	8	11	92	4	33	8	67	5	42	7	58
5	Oteşani 8 x Renclod verde	24	6	25	18	75	24	100	–	–	24	100	–	–
6	Oteşani 8 x Blue Free	50	18	37	32	63	50	100	–	–	12	24	38	76
7	Oteşani 8 x Gogoşele galbene	21	7	33	14	67	21	100	–	–	1	5	20	95
8	Oteşani 8 x Oteşani 8	49	5	10	44	90	49	100	–	–	49	100	–	–
9	Oteşani 8 – iradiat (V_2)	147	17	12	130	88	147	100	–	–	147	100	–	–

Scanned with OKEN Scanner

În anul 1991 s-a determinat structura genetică şi frecvenţa genelor albinotice într-o populaţie de indivizi Oteşani 8 care manifestă o dominanţă completă (tabelul 4). Prin autopolenizare se obţin două fenotipuri distincte: AA şi Aa de culoare verde şi fenotipul aa homozigot recesiv albinotic (dacă se consideră un locus cu două alele).

Tabelul 4

Modul de transmitere în descendenţă a fenotipului în cazul utilizării ca genitor matern a portaltoiului Oteşani 8

(Way of transfer of fenotype to the progenies using the rootstock Oteşani 8 as a maternal genitor)

Nr. crt. (No.)	Combinaţia hibridă (Hybrid combination)	Fenotip (Fenotype)								
		Genitor mamă (Material genitor)			Intermediar (Intermediary)			Genitor tată (Paternal genitor)		
		frunză (leaf), %	scoarţă (bark), %	muguri (buds), %	frunză %	scoarţă %	muguri %	frunză %	scoarţă %	muguri %
1	Oteşani 8 x *P. besseyi*	84,2	76,5	88,2	17,6	5,9	5,9	–	17,6	5,9
2	Oteşani 8 x (*P. besseyi* x americana)	87,5	87,5	87,5	12,5	12,5	12,5	–	–	–
3	Oteşani 8 x *P. spinosa*	33,3	33,3	33,3	66,7	66,7	66,7	–	–	–
4	Oteşani 8 x Silvia	–	–	50,0	50,0	–	50,0	50,0	100,0	–
5	Oteşani 8 x Renclod verde	75,0	75,0	100,0	–	25,0	–	25,0	–	–
6	Oteşani 8 x Blue Free	18,6	14,0	69,8	55,8	14,0	27,9	25,6	72,0	2,3
7	Oteşani 8 x Gogoşele galbene	30,0	10,0	50,0	60,0	80,0	50,0	10,0	10,0	–
8	Oteşani 8 x Oteşani 8	100,0	100,0	100,0	–	–	–	–	–	–
9	Oteşani 8 – iradiat (V_2)	100,0	100,0	100,0	–	–	–	–	–	–

Din determinările efectuate la un număr de 2 120 plante s-au găsit 1,8% (38,2) ca fiind albinotici recesivi.

Frecvenţa a două alele ale unei gene este egală cu unitatea:

$$p_A + q_a = 1$$

Se determină frecvenţa genotipurilor într-o populaţie prin ridicarea la pătrat a binomului de frecvenţe ale celor două alele, astfel:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

$$q_{aa}^2 = 1,8\% = 0,018$$

$$q_a = \sqrt{q_{aa}^2} = \sqrt{0,018} = 0,135$$

Cunoaştem că $p + q = 1$, deci $p = 1 - q$

$$q = 0,135$$

$$p = 0865$$

Cu ajutorul datelor obţinute se poate deduce probabilitatea distribuţiei celor trei genotipuri:

$$(p_A + q_a)^2 = p^2_{AA} + 2pq_{Aa} + q^2_{aa} =$$
$$= 0,865^2 + 2(0,865)(0,135) + 0,135^2 =$$
$$= 0,749 + 0,233 + 0,018 = 1$$

De aici putem discrimina genotipul dominant homozigot AA faţă de cel heterozigot Aa:

$$0,749\ AA + 0,233\ Aa + 0,018\ aa = 100\%$$

în care:

aa = 1,8% – albinotici recesivi;
AA = 74,9% – verzi homozigoţi dominanţi;
Aa = 23,3% – verzi heterozigoţi.

În continuare deducem frecvenţa genelor (p = A, q = a), iar AA = P, aa = Q şi Aa = H:

$$p_A = P + \frac{H}{2} = 74,9 + \frac{23,3}{2} = 86,6\% = 0,866$$

$$q_a = Q + \frac{H}{2} = 1,8 + \frac{23,3}{2} = 13,4\% = 0,134$$

$$p_A + q_a = 86,6\% + 13,4\% = 100\%$$

Gena recesivă (aa) responsabilă de producerea albinismului, în stare homozigotă duce la moartea plantelor respective şi deci are loc o selecţie împotriva acestei gene în mod normal.

În cadrul acestei populaţii s-a constatat totuşi că indivizii prezintă nuanţe diferite de culoare la frunze (verde-gălbui la verde-intens), motiv pentru care considerăm că starea de echilibru genetic a populaţiei nu este complet elucidată. Pentru aceasta este necesară precizarea numărului de loci implicaţi, numărul de alele şi stabilirea modului de transmitere în descendenţă a acestui caracter.

CONCLUZII

▼ Portaltoiul Oteşani 8 folosit ca genitor în programul de ameliorare genetică la prun prezintă importanţă deosebită datorită caracterelor sale, dar şi prin influenţa pe care o manifestă în sporirea variabilităţii acestor caractere la descendenţi.

▼ Oteşani 8, în combinaţie cu alţi genitori, tip dwarf şi semidwarf, creează o lărgire a variabilităţii privind vigoarea de creştere la descendenţii folosiţi ca portaltoi, în special în sensul reducerii acesteia.

Scanned with OKEN Scanner

▼ Oteşani 8 a influenţat puternic modul de transmitere a caracterelor privind exprimarea fenotipului, a prezenţei drajonilor, a prezenţei spinilor şi a tipului de fructificare. Determinismul genetic al acestor caractere nu a putut fi încă elucidat datorită complexităţii structurii genetice la nivelul genitorilor şi descendenţilor.

▼ Structura genetică şi frecvenţa genelor în populaţia de Oteşani 8 constituie o posibilă soluţie în stabilirea modului de transmitere a unor caractere, pentru portaltoi, având în vedere existenţa homozigoţilor recesivi albinotici în descendenţă.

INVESTIGATIONS ON CHARACTERS VARIABILITY OF SOME PROGENIES OF OTESANI 8 PLUM VARIETY, EMPLOYED TO OBTAIN NEW ROOTSTOCKS

SUMMARY

Otesani 8 rootstock was used as genitor in the plum breeding program thanks to its valuable characteristics such as: semidwarf vigour, high adaptability to clay soils, good grafting compatibility. The progeniens of this rootstock obtained by hybridization (F_1), selfpollination (C_1) variability of some major characters.

Although, a higher occurence of suckers, thorns, as well as fruiting type have been noticed, their genetic determinism is not obvious yet.

Otasani 8 seems to be important both for its genetic structure and also for genes frequency in determining the inheritance way which is due to the whitish recessive homozigous progenies in this population.

BIBLIOGRAFIE

Gallais A., 1990 – Theorie de la selection en amelioration des plantes. Ed. Masson, Paris.
Falconer D.S. 1964 – Introducerea în genetică cantitativă. Ed. Agro-Silvică, Bucureşti.
Ollivier L., 1981 – Elementes de genetique quantitative, Ed Masson – Paris.

Scanned with OKEN Scanner

UNELE PARTICULARITĂŢI EMBRIOLOGICE ALE AUTOPOLENIZĂRII NUCULUI

M. A. PÂNTEA*

Crearea de noi soiuri şi promovarea culturii nucului (*Juglans regia* L.) este imposibilă, fără cunoaşterea potenţialului autopolenizării lui, fără stabilirea gradului de autofertilitate şi a particularităţilor biologice ale întregului sistem de reproducere. Paralel cu alegerea formelor valoroase şi crearea sortimentului de nuci, cercetătorii au urmărit în permanenţă posibilitatea manifestării autocompatibilităţii pentru fiecare din genotipurile interesante (Axakov, 1940; Gareev, 1975; Nedev, Stefanova, 1979; Pântea, 1990). Puţinele investigaţii efectuate în direcţia elucidării aspectelor arătate mai sus au avut în principal un caracter fenologic. De cele mai dese ori concluziile formulate sunt contradictorii. Fără îndoială că asupra acestui fapt s-a răsfrânt în mare parte influenţa condiţiilor climatice din diferite zone ale arealului de răspândire a nucului. Din cele expuse este evidentă necesitatea cercetărilor microscopice ale aspectelor biologice ale înfloririi, polenizării şi legării fructelor la nuc în condiţiile polenizării libere comparativ cu diferite tipuri de polenizare la nivelul unui sortiment concret.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

În experimente a fost folosit material biologic de la 12 soiuri de nuc, incluzând toate tipurile de înflorire: protoginie – Kr-66, Is-67, D-17, I-28, S-65, I-57; protandrie – I-24, B-200-19; No 30, No 16, D-1 şi simultaneitatea înfloririi florilor masculine şi feminine (homogamie) – soiul Chişiniovschii (I-33). Izolarea florilor feminine a fost efectuată cu ajutorul săculeţilor confecţionaţi din material filtrant special (F-PP 15), ce nu permite penetrarea particulelor mai mici de 10 microni în

* Institutul de Pomicultură, Chişinău, Republica Moldova

Scanned with OKEN Scanner

diametru. Polenul utilizat în autopolenizări a fost colectat din amenţii la care 1/4 din florile masculine au început a elimina polen. Autopolenizarea experimentală a fost efectuată la 3–4 zile după începerea desfacerii stigmatului. Preparate anatomice de flori feminine au fost fixate în soluţiile Navaşin, Chemberlain şi Modilevschii în următoarele intervale de timp: 3, 7, 12, 15, 35, 45 şi 60 de zile după polenizare. După parafinarea materialului au fost pregătite secţiuni cu grosimea de 10–18 mm în dependenţă de structurile luate în studiu. Colorarea preparatelor permanente a fost efectuată după Navaşin şi Modilevschii (Prozina, 1960). Germinaţia polenului pe stigmate şi particularităţile creşterii tuburilor polinice în toate sectoarele pistilului au fost cercetate prin utilizarea microscopiei luminiscente (fluorochrom – aniline blue), adaptate pentru nuc de Pantea, 1984.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Controlul legării fructelor în rezultatul autopolenizării artificiale a demonstrat posibilitatea autofertilităţii soiurilor cercetate, indiferent de tipul de înflorire: soiurile protandre – 30,2%, soiurile protogine – 55,50%, soiul cu tip de înflorire simultan, I-33, – 58,2%. Analiza microscopică a comportării polenului propriu pe stigmat, germinaţia lui şi a particularităţilor creşterii tuburilor polinice în toate sectoarele pistilului au confirmat, în modul cel mai elocvent, prezenţa autocompatibilităţii atât la soiul cu înflorire simultană a florilor masculine şi feminine, cât şi la soiurile protogine şi protandre (tabelul 1). Pe stigmatul florii feminine polenizate cu polenul soiului propriu este depistată o fluorescenţă mai mult sau mai puţin intensivă a 30–50 grăunciori de polen (3,0–5,0 puncte pentru soiurile protandre; 3,5–4,5 puncte pentru soiurile protogine). De la începutul fazei progamice se observă clar o comportare individuală a soiurilor ce aparţin la diferite tipuri de înflorire. Astfel, la soiul protandru B-200-19, fluorescenţa grăunciorilor de polen este destul de slabă la nivelul stigmatului, având o culoare brună deschisă. La soiul I-28, grăunciorii de polen au o fluorescenţă galben-aurie. Tuburile polinice, deja formate pe stigmat, pătrund în ţesuturile stilului şi, de obicei, cresc intracelular, paralel cu fasciculele vaselor conducătoare. Pe tot parcursul stilului ele nu formează nodozităţi sau curbe – simptome tipice ale incompatibilităţii.

La nivelul nucelei ovulului, numărul tuburilor polinice este redus la numai 3–5, ele ajungând în sacul embrionar cu 2–3 zile mai târziu decât în cazul polenizării libere, sau la diferite variante de încrucişare intervarietală compatibilă. La toate tipurile de înflorire pătrunderea tuburilor polinice în nucela ovulului este halazogamică. La nivelul halazei se notează cea mai susceptibilă diferenţă a manifestării autocompatibilităţii nucului în dependenţă de tipul de înflorire, în aşa fel încât datele obţinute demonstrează că la soiurile protandre B-200-19 şi No 30 are loc creşterea a mai mult de 2–4 tuburi polinice în ţesuturile nucelei şi chiar pătrunderea lor în sacul embrionar (fig. 1). Procesul fecundaţiei duble are loc cu o întârziere de 2–4 zile în cazul autopolenizării soiurilor, în comparaţie cu polenizarea lor liberă. Ulterior se reţine şi dezvoltarea pe mai departe a endospermului şi a zigotului. Ca regulă, prima şi a doua diviziune a zigotului au loc peste 10–12 zile după procesul fecundaţiei duble.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Analiza microscopică luminiscentă a fazei progamice a autopolenizării artificiale a nucului
(Microscopic luminescent analysis of programmatic stage of artificial selfpollination of Walnut)

Soiul (Cultivar)	Grăunciori de polen şi tuburi polinice în zona stigmatului (Pollen grains and pollenic tubes in stigma area)		Particularităţile creşterii tuburilor polinice în stil (Characteristics of pollenic tube growth in stigma)	Gradul de penetrare a tubului polinic în stil (Penetration degree of pollenic tube in stigma)			
	germinaţia grăunciorilor de polen (punte) (germination pollen grains, points)	caracteristica creşterii tuburilor polinice (characteristics of pollenic tubes)		la 1/3 (at 1/3)	de la 1/3 la 1/2 (from 1/3 to 1/2)	de la 1/2–1 (from 1/2–1)	în zona halazei (in chalazal area)
a) Soiuri protogine							
Kr-66	4,5	fluorescenţă normală a tubului polinic	ritm slab de creştere a tubului polinic	4,0	3,5	3,5	3,5
Is-67	4,5	– „ –	– „ –	4,0	3,5	3,0	3,0
D-17	4,0	– „ –	– „ –	4,0	3,0	3,0	2,0
I-28	4,5	1/3 din tubul polinic are fluorescenţă slabă	– „ –	4,0	3,0	3,0	3,0
S-65	4,0	– „ –	– „ –	4,0	3,2	3,0	3,0
I-57	4,5	fluorescenţă foarte intensivă a tubului polinic	– „ –	4,0	3,5	2,0	2,5
Control I-57, pol. liberă	4,5	– „ –	ritm optim de creşt. a tub. polinic	4,5	4,0	3,5	3,5
b) Soiuri protandre							
I-24	3,0	începutul creşterii tubului polinic este întârziat	tubul polinic depistează greu	3,0	3,0	2,5	2,0
D-1	5,0	fluorescenţă intensivă a tub. polinic	ritm slab de creşt. a tub. polinic	4,0	3,5	3,0	3,0
B-200-19	3,0	fluorescenţă bună a tub. polinic	ritm f. slab de creşt. a tub. polinic	3,0	2,0	1,0	1,0
N 30	4,0	fluorescenţă intensivă a tub. polinic	ritm slab de creşt. a tub. polinic	3,5	3,0	3,0	1,0
N 16	4,0	– „ –	– „ –	4,0	3,5	3,0	2,0
Control N 16 pol. liberă	4,5	– „ –	ritm normal de creşt. a tub. polinic	4,0	3,5	3,5	3,0
c) Soiuri homogame							
I-33	4,5	fluorescenţă normală a tub. polinic	ritm slab de creşt. a tub. polinic	4,0	3,0	3,0	3,5
Control I-33, pol. liberă	4,5	– „ –	ritm normal de creşt. a tub. polinic	4,0	3,5	3,5	3,0

Scanned with OKEN Scanner

După ce embrionul a intrat în faza de dezvoltare – globula, având mai mult de o mie de celule, are loc o accelerare a creşterii embrionului şi o dispariţie rapidă a endospermului celular. Astfel, se poate explica fenomenul coincidenţei diferenţierii complete şi a maturizării simultane a embrionilor, proveniţi de la autopolenizare cu cei formaţi prin polenizarea liberă.

Studiul evoluţiei proceselor citoembriologice pe parcursul perioadelor progamice, gamogamice şi postgamice depistează şi unele deviaţii specifice autopolenizării nucului. Unele din ele se întâlnesc deopotrivă la soiurile protogine şi la cele protandre. Astfel, în unele cazuri de penetrare întârziată a tubului polinic în sacul embrionar, nucleii polari sunt hipertrofiaţi fără să fie fuzionaţi. În nucleolii formaţi pot apărea vacuole mici (fig. 2). Au loc şi schimbări însemnate în structura morfologică a oosferei. Conturul membranei ei devine gofrat, citoplasma rarefiată. Deşi cu o mai mare întârziere, fecundaţia ei are loc şi în aceste cazuri.

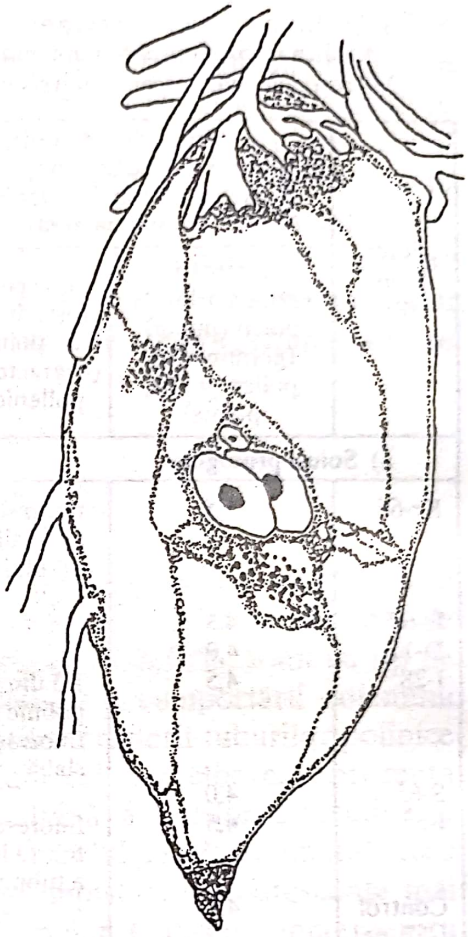


Fig. 1 – Creşterea a mai multor tuburi polinice în nucelă şi pătrunderea lor în sacul embrionar (Growth of some pollen tubes in nucellus and their penetration in embryo sac)

La toate tipurile de înflorire se observă şi o blocare a dezvoltării evolutive a endospermogenezei (fig. 2, fig. 3).

Cauza frecventei căderi a florii autopolenizate la nuc se explică prin faptul că un sector al fecundaţiei duble se exclude. Ca regulă, are loc numai fecundaţia nucleului secundar al sacului embrionar. În aceste cazuri, în jurul celor 6–8 nuclei endospermali formaţi în rezultatul primelor diviziuni mitotice după fecundaţie are loc o acumulare rapidă de granule mari de polizaharide (fig. 3, fig. 4). În acelaşi timp, se observă o activitate fiziologică foarte evidentă a celulelor hipostazei.

Conform datelor experimentale obţinute, soiurile protandre se deosebesc de cele protogine prin faptul că deşi actul fecundaţiei duble se produce în sacul embrionar, totuşi peste 2–3 zile pot apărea procesele de degenerare a structurilor întregului ovul. La început ele se reflectă în straturile interioare de celule integumentale, iar peste 5–7 zile ele cuprind şi zonele adiacente ale sacului embrionar.

S-a observat că manifestarea pozitivă a autocompatibilităţii soiurilor protandre este stopată de stresul hidric produs de secetă din perioada polenizării.

Scanned with OKEN Scanner

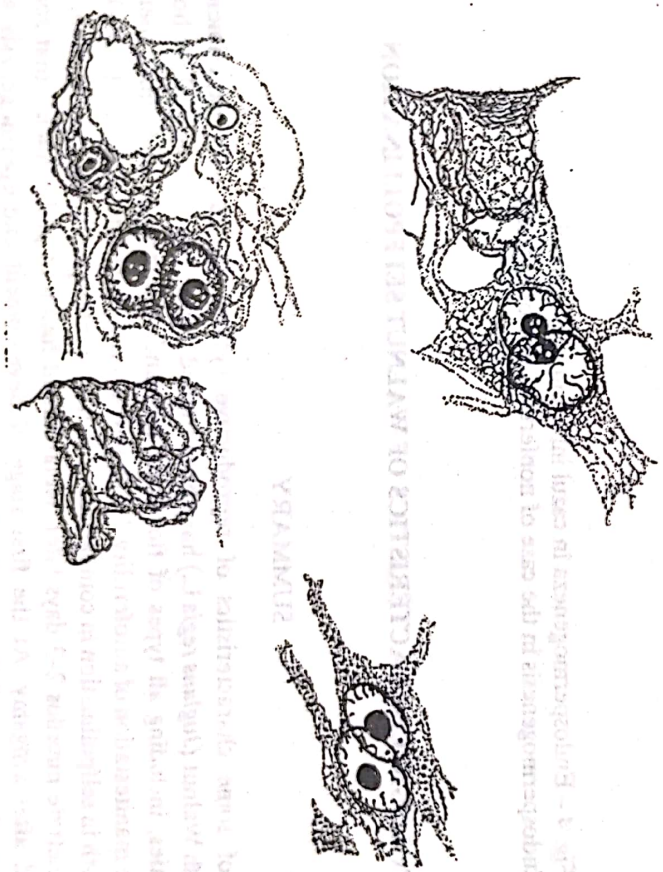


Fig. 2 – Hipertrofia nucleilor polari, apariția vacuolelor în nucleoli și depozitarea granulelor de polizaharide (Hipertrophy of pollar nuclei, appearance of vacuoles and depositing of polysaccharide granules)

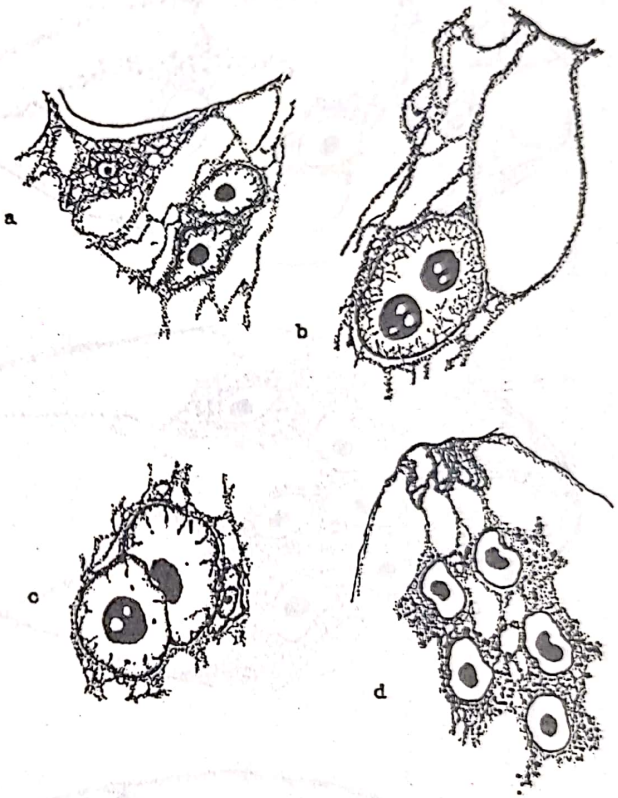


Fig. 3 – Degenerarea oosferei (a), fuziunea nucleilor polari și apariția vacuolelor în nucleoli (b, c), formarea endospermului nuclear (d). (Degeneration of eggcell (a), fusion of polar nuclei and formation of vacuoles in nucleoli (b, c), formation of nuclear endosperm (d)).

Scanned with OKEN Scanner

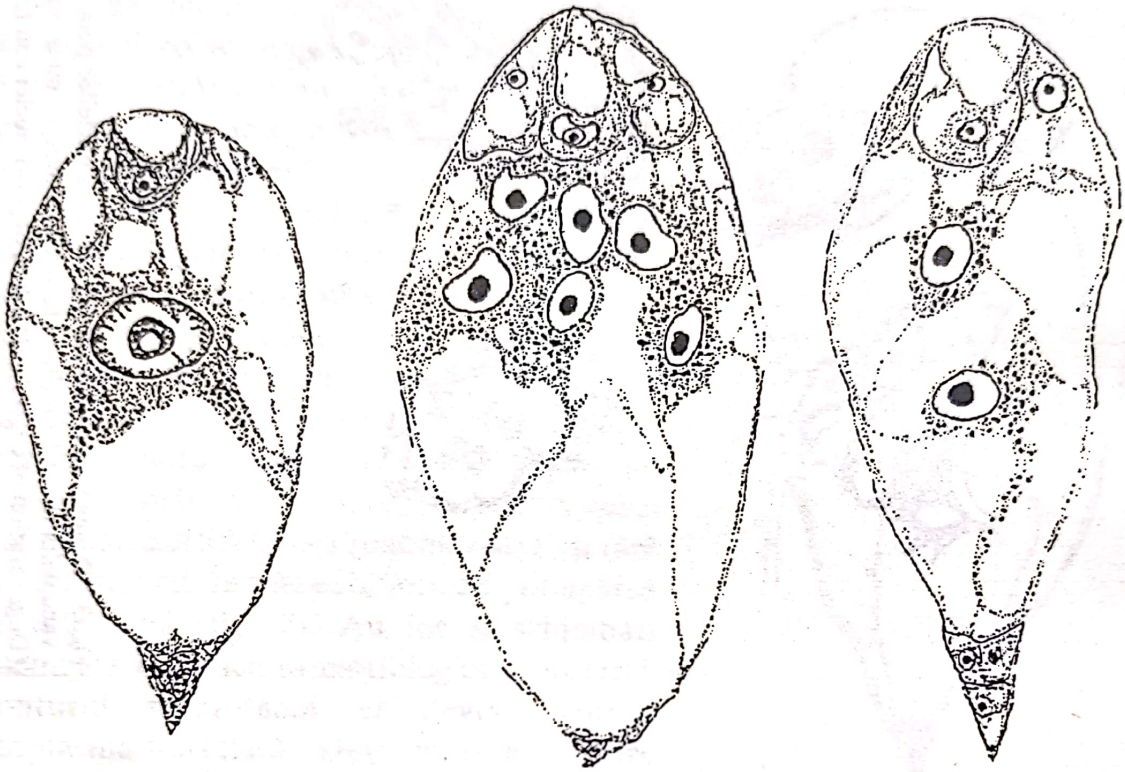


Fig. 4 – Endospermogeneza în cazul infecundației oosferei.
(Endospermogenesis in the case of nonfertilization of eggcell)

SOME EMBRYOLOGIC CHARACTERISTICS OF WALNUT SELFPOLLINATION

SUMMARY

Manifestation of some characteristics of reproductive system related with experimental selfpollination of English Walnut (*Juglans regia* L.) have been studied using cytoembryological methods. The investigated varieties, including all types of flowering (protandry, protogeny and simultaneity) demonstrated a positive manifestation of autofertility. In all parts of pistil there was established a smaller rate of pollen tube growth in selfpollination in comparison with free or intraspecific cross pollination. As a rule, pollen tubes penetrate nucellus 2–3 days later. Retardarded fusion of pollar nuclei, that some times may be detected after syngamy. At the first stage of development endospermogenesis and embryogenesis, are also characterized by a delaied rhythm. Only in the final stage of embryo differentiation of a evident synchronization of the morphophysyology of the whole fruit is stabilized.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

Axakov G. M., 1940 – Plodonosenie greţkogo oreha. Greţkii oreh Iujnoi Kirgizii, Taşkent: 60–106.
Gareev M. E., 1975 – O vozmojnosti samoopîlenia greţkogo oreha. Izv. A. N. Kirg., SSR, 3: 36–97.
Nedev N. V., Stefanov A., 1979 – Izsledovaniia virhu opraşvaneto i oplojdaneto na oreha (*Juglans regia* L.). Gradin., lozarska Nauka, 16, 7–8: 3–11.
Prozina M. N., 1960 – Botaniceskaia mikrotehnika. M. Vîssaia şkola: p. 206.
Pantea M. A., 1984 – Liuminesţentnaia mikroskopia pri izucenii opîlenia greţkogo oreha. Geneticeskie osnovî selekţii selskohoziaistvennîh rastenii i jivotnîh. Chişinev: 125–126.
Pantea M. A., 1990 – Perekrestnoie opîlenie i samoopîlenie raionirovannîh i perspektivnîh sortov i form greţkogo oreha. Sortoizucenie i selekţia plodovîh kultur. Kişinev: 4–10.

Scanned with OKEN Scanner

UNELE CARACTERE ALE CONURILOR ŞI SEMINŢELOR OBŢINUTE DIN ÎNCRUCIŞĂRI DIALELE LA MOLIDUL CU COROANĂ ÎNGUSTĂ ŞI CU COROANĂ NORMALĂ

GH. PÂRNUŢĂ*

Au fost realizate încrucişări dialele complete la molid, între arbori ideotip cu coroană îngustă (*Picea abies* f. *pendula* (Lawson) Sylvén) şi molizi cu coroană normală (*Picea abies* L.) (Karst.), pentru cunoaşterea mecanismelor de moştenire a caracterelor, în mod deosebit importanţa relativă a varianţelor genetice de aditivitate, dominanţă şi epistazie.

Evaluări complete ale varianţei componentelor, incluzând şi efectele datorate autopolenizării, efecte materne şi reciproce, pot fi obţinute numai din experimente bazate pe încrucişări controlate cu dispozitive experimentale specifice (Comstock şi Robinson, 1952).

Obiectivele acestei prime lucrări, din cercetările iniţiate, sunt:

- estimarea varianţei componentelor şi a efectelor relative ale celor doi părinţi în variaţia caracterelor conurilor şi seminţelor de molid;
- determinarea variaţiei unor caractere ale seminţelor de molid în funcţie de tipul de polenizare: încrucişată controlat, autopolenizare controlată şi polenizare liberă;
- determinarea capacităţii generale (CGC) şi specifice (CSC) de combinare pentru masa a 1 000 seminţe pline de molid.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Sistemul de încrucişare ales este dialel complet (6 × 6) de tipul $v = p^2$, adică numărul de variante (v) este egal cu pătratul numărului de arbori încrucişaţi (p); au fost făcute toate încrucişările, inclusiv autopolenizări şi încrucişări reciproce, dar în anumite analize autopolenizările pot fi omise (Morgenstern, 1974). Arborii aleşi pentru încrucişare au fost trei ideotipuri de molid cu coroană îngustă (P 1, P 7 şi P 66) şi trei molizi cu coroană normală (C 39, C 40, C 41). Experimentul s-a realizat

* Institutul de Cercetări şi Amenajări Silvice, Bucureşti

Scanned with OKEN Scanner

într-un arboret de molid (Stâna de Vale, la 1 200 m altitudine) în mai–iunie 1991. Conurile au fost recoltate în octombrie 1991 și prelucrate în același an. Semințele pline au fost separate de cele seci prin imersie în alcool etilic (97°); determinarea masei a 1 000 semințe pline s-a făcut prin cântărire la balanță analitică cu precizia de 1 mg.

Modelul de calcul statistic adoptat este „FULL DIALLEL" ce permite analiza dublă a variației pentru toate tipurile de încrucișare; semnificația varianțelor statistice s-a determinat prin testul F.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Toți părinții au produs semințe pline în toate tipurile de încrucișare (tabelul 1).

Numărul mediu de semințe pline pe con (tabelul 2) pentru familii autopolenizate (AP) este semnificativ mai mic decât pentru familii încrucișate (PI), atât pentru arborii mamă ideotip, cât și pentru cei de molid comun. În cazul familiilor AP, numărul mediu de semințe pline a fost mai mare la ideotipuri decât la molizi comuni în timp ce pentru familii PI ordinea este inversată. Amplitudinea de variație a valorilor medii și abaterile lor standard (s) sunt mai mici la ideotipuri

Tabelul 1

Materiale biologice obținute din încrucișări dialele
(Biological materials obteined by diallel crosses)

Mamă (Female) / Tată (Male)		Coroană îngustă (Narrow crown)			Coroană normală (Normal crown)		
		P 1	P 7	P 66	C 39	C 40	C 41
Coroană îngustă							
P 1	* Flori polenizate	7	7	7	7	5	7
	** Conuri recoltate	7	4	3	6	2	7
	*** Total semințe pline	130	715	389	136	46	815
P 7	Flori polenizate	10	7	7	7	8	12
	Conuri recoltate	10	4	7	7	8	11
	Total semințe pline	643	115	622	91	773	917
P 66	Flori polenizate	12	8	8	10	7	8
	Conuri recoltate	5	8	5	9	2	3
	Total semințe pline	616	1 005	200	189	153	404
Coroană normală							
C 39	Flori polenizate	10	12	8	8	8	12
	Conuri recoltate	7	6	8	5	6	10
	Total semințe pline	753	798	738	11	658	1 208
C 40	Flori polenizare	13	12	18	12	14	17
	Conuri recoltate	13	12	18	11	14	14
	Total semințe pline	1 696	812	1 717	510	175	1 004
C 41	Flori polenizate	11	12	16	20	13	14
	Conuri recoltate	11	12	15	20	13	14
	Total semințe pline	655	1 463	1 380	216	1 402	792

* Pollinated flowerrs; ** Harvested cones; *** Total filled seeds

Tabelul 2

Variaţia numărului mediu de seminţe pline pe con în funcţie de tipul de încrucişare
(Variation of the mean number of filled seeds per cone depending on the cross type)

Părinte mamă (Female parent)	Numărul de seminţe pline pe con (Number of filled seeds per cone)	
	autopolenizare(AP) (selfed)	polenizare încrucişată (PI) (outcrossed)
Coroană îngustă (Narrow crown)		
P 1	18,6	94,1
P 7	28,8	69,2
P 66	40,0	96,2
Media ($\bar{x} \pm s$)	29,13 ± 10,70	86,50 ± 15,02
Coroană normală (Normal crown)		
C 39	2,2	112,7
C 40	12,5	82,3
C 41	56,6	78,6
Media ($\bar{x} \pm s$)	23,77 ± 28,90	91,20 ± 18,71
Media generală ($\bar{x} \pm s$)	26,45 ± 19,71	88,85 ± 15,39

decât la molizii comuni pentru ambele tipuri de familii (AP şi PI). Procentul mare de seminţe seci după autopolenizare indică o mare frecvenţă a genelor letale şi subletale la molid (Anderson, 1965), iar Koski (1973) estimează că 90% din embrionii autopolenizaţi sunt avortaţi.

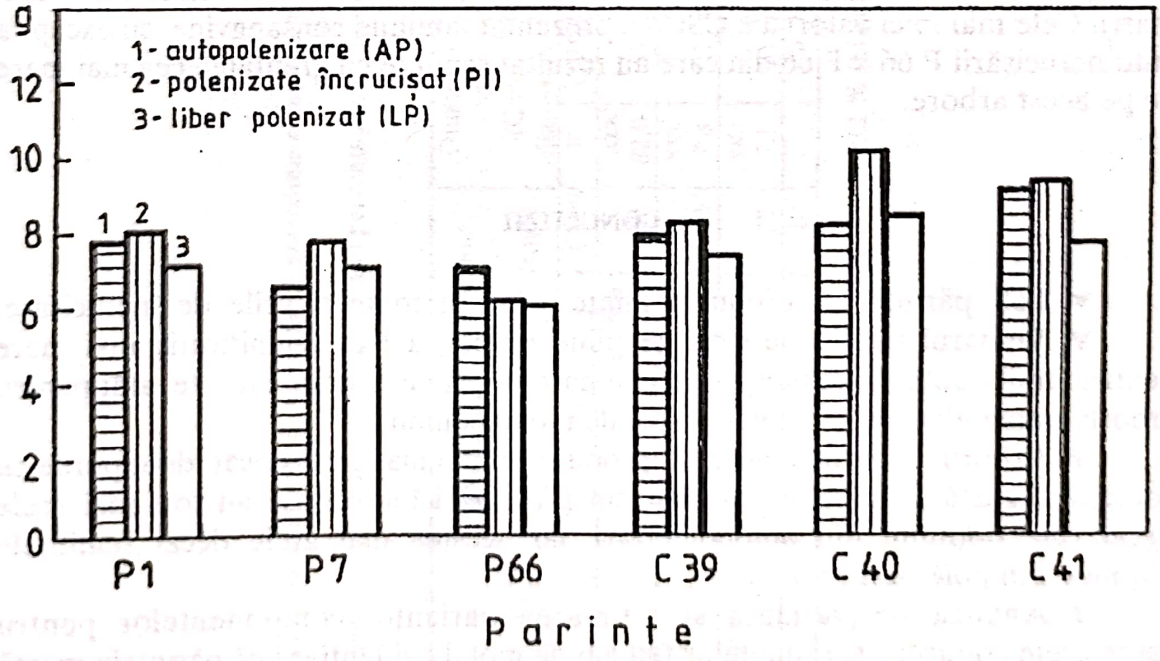


Fig. 1 – Variaţia masei medii a 1 000 seminţe de molid pentru familii autopolenizate (AP), polenizate încrucişat (PI) şi liber-polenizate (LP) (Variation of the mean 1 000 spruce seeds weight for self-pollinated (AP), outcrossed (PI) and open-pollinated (LP) families)

Scanned with OKEN Scanner

Media masei a 1 000 seminţe pline de molid relevă că seminţele arborilor ideotip cu coroană îngustă au fost mai uşoare decât cele ale molizilor comuni (figura 1). În general, seminţe mai grele au fost obţinute din polenizări încrucişate (excepţie ideotipul P 66), decât din autopolenizări şi polenizare liberă; seminţele din familii autopolenizate au fost mai grele decât cele din polenizare liberă. Seminţele din polenizare liberă au fost, în toate cazurile, mai uşoare decât cele din polenizări încrucişate, cu diferenţe în greutatea a 1 000 seminţe de la 0,06 g (P 66) la 1,58 g (C 40).

În această privinţă este posibil să fi influenţat şi protejarea strobililor în pungi de izolare, în timpul înfloririi şi după fecundare, având în vedere condiţiile de ploaie şi temperatură sub 10°C din acea perioadă; o asemenea ipoteză a fost enunţată şi de Skroppa (1990). Anderson (1965) şi Skroppa (1990) au găsit, de asemenea, o variabilitate intra şi interpopulaţională largă pentru greutatea seminţelor pline de molid şi că aceasta este afectată atât de părintele matern, cât şi de condiţiile de mediu. Greutatea seminţelor este importantă şi din cauza posibilei sale influenţe asupra caracterelor măsurate în populaţia de puieţi.

Analiza varianţei şi estimarea varianţei componentelor pentru caracterele conurilor şi seminţelor full-sib de molid (tabelul 3) evidenţiază că părintele mamă justifică între 48 şi 75 % din varianţa totală a caracterelor. Interacţiunea celor doi părinţi are o pondere cuprinsă între 17 şi 51 %, în timp ce efectul patern este mai slab (între 0 şi 6 %), dar semnificativ.

Capacitatea generală (CGC) şi specifică (CSC) de combinare determinată pentru masa a 1 000 seminţe (tabelul 4) evidenţiază faptul că arborii de molid comun au CGC superioară ideotipurilor, atunci când sunt mame dar, în general, inferioară acestora ca taţi. CSC a fost superioară pentru tipurile de încrucişare ideotip x molid comun şi molid comun x ideotip (cu valori foarte semnificativ mai mari). Cele mai mici valori ale CSC au prezentat familiile consangvine, cu excepţia autoîncrucişării P 66 x P 66 din care au rezultat seminţe cu greutatea cea mai mare de pe acest arbore.

CONCLUZII

▼ Toţi părinţii au produs seminţe pline în toate tipurile de încrucişare.

▼ Numărul mediu de seminţe pline pe con a fost semnificativ mai mare pentru familii polenizate încrucişat, comparativ cu cele autopolenizate, atât pentru arborii mamă ideotip, cât şi pentru cei de molid comun.

▼ Arborii de molid comun au produs seminţe mai grele decât ideotipurile cu coroană îngustă; seminţele obţinute din polenizări încrucişate au fost mai grele decât cele obţinute din autopolenizări, iar acestea mai grele decât seminţele obţinute din polenizare liberă.

▼ Analiza de varianţă şi estimarea varianţei componentelor pentru caracterele conurilor şi seminţelor full-sib de molid evidenţiază că părintele mamă explică între 48 şi 75 % din varianţa totală a caracterelor. Interacţiunea celor doi părinţi are o pondere cuprinsă între 17 şi 51 % în timp ce efectul patern este mai slab (între 0 şi 6 %), dar semnificativ.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3

Valorile F ale analizelor de varianță* și procentele componentelor majore de varianță (CV %) pentru unele caractere la conuri și semințe full-sib de molid

(F values of the analyses of variance* and percentages of the major variance components (CV %) for some characters in full-sib cones and seeds of spruce)

Caracter (Character) / Componentă (Component)	Lungime con (Cone lenght)		Diametru con (Cone diameter)		Masa a 1 000 semințe (1 000 filled seeds weight)		Lungime sămânță (Seed length)		Lățime sămânță (Seed width)		Grăsime sămânță (Seed thickness)		Lungime aripă (Wing length)		Lățime aripă (Wing width)	
	F	CV%	F	CV%	F	CV%	F	CV%	F	CV%	F	CV%	F	CV%	F	CV%
Mamă (M)	xxx 41,9	67	xxx 82,0	63	xxx 1661,5	75	xxx 274,9	73	xxx 200,9	72	xxx 196,6	69	xxx 489,1	71	xxx 75,3	48
Tată (T)	2,1	0	xxx 7,8	1	xxx 112,2	1	xxx 18,5	2	xxx 5,9	5	xxx 14,9	6	xxx 55,6	4	x 3,2	1
Interacțiune (M x T)	xx 3,1	23	xxx 7,1	31	xxx 81,6	24	xxx 14,9	23	xxx 10,1	17	xxx 10,5	19	xxx 27,1	24	xxx 12,5	51
Eroare		10		5		0		2		6		6		1		4

* Niveluri de semnificație: x, 5 %; xx, 1 %; xxx, 0,1 % (Significance levels)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4

Capacitatea generală (CGC) şi specifică (CSC) de combinare * pentru masa de 1 000 seminţe pline de molid

(General (GCA) and specific (SCA) combining ability for 1 000 filled seeds weight of spruce)

Arbore (Tree)	♂ P 1	P 7	P 66	C 39	C 40	C 41	CGC (GCA) ♀
♀	Valori CSC (SCA Values)						
P 1	–0,21	–0,02	0,14	–0,42	xxx 0,38	0,12	–0,19
P 7	–0,50	–0,64	–0,31	xxx 1,30	–0,01	0,17	–0,63
P 66	xxx 0,38	–0,16	xxx 0,44	–0,07	0,05	–0,64	–1,82
C 39	–0,33	xxx 0,28	–0,61	–0,76	xxx 0,70	xxx 0,72	0,0002
C 40	xxx 0,94	0,01	xxx 1,05	–0,25	–1,34	0,41	xxx 1,56
C 41	–0,27	xxx 0,52	–0,71	x 0,21	x 0,21	0,03	xxx 1,08
CGC ♂ (GCA)	0,02	–0,34	xxx 0,26	xxx 0,46	–0,17	–0,24	

* Niveluri de semnificaţie: x, 5 %; xx, 1 %; xxx, 0,1 % (valori subliniate). (Significance levels x, 5 %; xx, 1%; xxx, 0,1 % (underlined values)

▼ Capacitatea generală de combinare (CGC) calculată pentru masa de 1 000 seminţe evidenţiază că molizii comuni au CGC superioară ideotipurilor când sunt mame, dar inferioară acestora când sunt taţi. Capacitatea specifică de combinare (CSC) a fost superioară pentru tipurile de încrucişare ideotip x molid comun şi molid comun x ideotip (cu valori foarte semnificativ mai mari faţă de cele rezultate din alte tipuri de încrucişare).

SOME CHARACTERS OF THE CONES AND SEEDS OBTAINED BY DIALLEL CROSSES IN THE NARROW AND NORMAL – CROWNED NORWAY SPRUCE

SUMMARY

A 6 x 6 diallel cross, between 3 narrow – crowned spruce ideotypes (P 1, P 7, P 66) and 3 normal – crowned Norway spruce (C 39, C 40, C 41) was performed in one Norway spruce stand (Stâna de Vale, altitude 1 200 m) to evaluate the relative role of additive and dominance genetic variance.

All parents produced filled seeds in all crosses. The number of filled seed per cone were significant higher for outcrossed full-sib families than self-pollinated families, both ideotype and common spruce trees. On the average, were more filled seeds in narrow-crowned ideotype than in common spruce trees, for selfpollinated families and less for outcrossed families. The common spruce trees produced heavier seeds than narrow-crowned ideotypes; seeds from controlled crosses were heavier than seeds from selfed families (excepting P 66), but seeds from selfed families were heavier (excepting P 7 and C 40) than seeds from open pollination. The maternal parent accountes between 48 and 75 % of the total variation of all characters. In addition a small, but statistically significant effect

Scanned with OKEN Scanner

(between 0 and 6 %) of the male parent was found. The general combining ability (CGA), calculated for 1 000 seeds weight, was higher for common spruce trees than ideotypes trees as females, and less as males. The specific combining ability (SCA) were higher for the cross types ideotype x common spruce and common spruce x ideotype.

BIBLIOGRAFIE

Anderson, E., 1965 – Cone and seed studies in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) Stud. for. Suec., 23: 1–214.

Comstock R. E., Robinson H. F., 1952 – Estimation of average dominance of genes. Heterosis, Iowa State College Press, Ames: 494–516.

Morgenstern E. K., 1974 – A diallel Cross in Black Spruce, *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. Silvae Genetica 23, 1–3: 67–70.

Skroppa T., Tho T., 1990 – Diallel Crosses in *Picea abies* (L.) Karst. I. Variation in Seed Yield and Seed Weight. Scand. J. For. Res. 5: 355–367.

Scanned with OKEN Scanner

CERCET. GENET. VEGET. ANIM., VOL. IV, 1996

TRANSFER DE GENE LA GENOTIPURI DE PLOP (*POPULUS*) PRIN UTILIZAREA DE TULPINI SĂLBATICE ŞI MODIFICATE GENETIC DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

MARGARETA IORDAN-COSTACHE,
ALEXANDRINA PĂTRAŞCU-CĂLIN,
AURELIA BREZEANU, CĂLINA-PETRUŢA CORNEA *

Ameliorarea genetică a arborilor prin strategiile convenţionale este un proces lent, de lungă durată şi dificil de realizat datorită, în primul rând, heterozigoţiei foarte accentuate, apoi dimensiunilor mari ale plantelor, perioadelor juvenile lungi, ca şi informaţiei reduse asupra eredităţii caracterelor importante. Ingineria genetică, prin tehnologia ADN recombinat, poate accelera introducerea unor trăsături noi la plante, cu condiţia să dispunem de un protocol potrivit pentru introducerea de noi gene în genomul celular ca şi de un sistem eficient de regenerare de plante de la celulele transformate genetic. Deşi transferul de gene mediat de vectori plasmidiali a devenit o tehnică de rutină pentru multe specii dicotiledonate, succesul a fost limitat în cazul celor lemnoase (Riemenschneider şi Haissig, 1991). Până în prezent sunt puţine rezultate cu privire la inserarea unor gene importante economic la arbori (Ahuja, 1988, 1991) şi nu există încă date certe despre funcţionarea acestora la descendenţa plantelor lemnoase transgenice (Klopfenstein şi Haissig, 1991). Se pot menţiona totuşi rezultatele recente privind încorporarea unor gene de rezistenţă la pesticide realizate la plop prin bombardament cu particule accelerate (McCown şi colab., 1992) sau prin transfer mediat de *A. tumefaciens* (Confalonieri şi colab., 1994) ca şi transformarea genetică în cazul unor plante de măr (Welander şi colab., 1991) a unor plante de nuc, larice (Huang şi colab., 1991) etc.

* Academia Română, Institutul de Biologie

Scanned with OKEN Scanner

În cazul genului *Populus*, primele succese de transformare genetică au fost raportate în 1986 (Fillati şi colab., 1986, 1987; Parson şi colab., 1986) urmate de cele ale lui Michler şi colab., (1988), Sellmer şi colab. (1989), Reimenscheider şi colab. (1988) etc., iar prima transformare şi regenerare a unei specii lemnoase cu o genă utilă de interes economic, gena aro A, ce conferă toleranţă, la erbicidul Roundap (glyphosat) a fost realizată în 1991 (Reimenscheider şi colab.). Gena a fost izolată de la bacteria *Salmonella typhimurim* (este o genă mutantă) şi introdusă în genomul plopului prin sistemul de vectori binari mediat de *A. tumefaciens*. Aceste rezultate au stimulat interesul pentru obţinerea de plante de plop cu rezistenţă şi la alt erbicid – Basta (phosphinothricine) – frecvent utilizat în plantaţiile intensive de plop şi mai ales pentru introducerea unor gene implicate în biosinteza ligninelor.

Lucrarea de faţă prezintă rezultate preliminare ale experimentelor ce vizează stabilirea unui protocol pentru introducerea şi exprimarea unor gene străine în genomul plopului tremurător în vederea obţinerii de plante transgenice.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Experimentele s-au efectuat pe genotipuri de plop tremurător cultivate *in vitro* şi anume *Populus tremula* cv Ahle, clonele 3.4, 3.2 şi *P. tremula* x *P. tremuloides* cv. Munden, clonele 4.3, 4.16, 4.18 (tabelul 1).

Cultura *in vitro* a clonelor de plop s-a realizat pe mediul nutritiv Murashige-Skoog (1962) (MS) modificat (1/3 concentraţia în macroelemente, vitamine

Tabelul 1

Sistematizarea condiţiilor experimentale şi a reactivităţii inoculilor
(Systematization of the experimental conditions and explants reactivity)

Factor (Factors)	Caracteristici (Characteristics)	Răspuns morfologic (Morphological response)
Clone	*P. tremula* cv. Ahle 3.4, 3.2 *P. tremula* x *P. tremuloides* cv. Munden 4.3, 4.16, 4.18	Reactivitatea clonelor la infecţie, a fost dependenţa de genotip (4.3, 4.16 mai susceptibile) şi de tulpina bacteriană utilizată
Tulpini de *A. tumefaciens*	A_6 octopinică (pTi ocs $^+$) C_{58} nopalinică (pTi nos $^+$) K_1 (pTi ocs + Km^R)	A_6, K_1 – inducere de tumori C_{58} – inducere de teratoame (buchete de lăstari anormali) sau/şi de tumori
Concentraţia suspensiei bacteriene	10^7–10^9 bacterii/ml	
Tipul de explante	Segmente de limb., petiol Segmente de tulpină	Tumori de tip crowngall Tunori şi/sau teratoame
Modul de infecţie	Rănire şi tamponare cu suspensie de A. tumefaciens	
Mediul de cultură (după Murashige şi Skoog, 1962)	MS (1962) fără hormoni (preselecţie); Mediu selectiv MS + kanamicină 50 mg/L	Diferenţiere şi creştere de lăstari cu rezistenţă la km

Scanned with OKEN Scanner

Gamborg, sucroză 20 mg/l) şi suplimentat cu acid indolil-butriric (IBA) 0,5–1,0 mg/l, iar multiplicarea lor s-a efectuat prin microbutăşire (segmente de 0,5–1,0 cm cu 1–2 muguri axilari repicate pe mediul MS (1962) suplimentat cu factori de creştere: benzilaminopurină (BAP) 1,0–2,0 mg/l şi acid indolilacetic (IAA) 0,2 mg/l.)

Plăntuţele în vârstă de 4–5 săptămâni (4–5 cm lungime) au fost utilizate ca sursă de explante pentru experimentele de transformare şi anume: segmente de tulpină cu sau fără muguri axilari, segmente de frunze cu sau fără peţiol şi frunze întregi. Explantele au fost infectate prin rănire şi tamponare cu o suspensie de *Agrobacterium tumefaciens* (de 24 ore). S-au utilizat două tulpini de tip sălbatic de *Agrobacterium* şi anume: tulpina octopinică A_6 (pTi ocs $^+$) şi tulpina nopalinică C_{58} (pTi nos $^+$) precum şi tulpina K_1 care conferă rezistenţă la kanamicină şi care provine din tulpina A_6 modificată în laborator prin inserţia transpozonului Tn 5 în plasmida Ti ($pTiA_6Km^R$). După infectare, explantele au fost inoculate pe mediul MS (1962) fără hormoni, dar cu adaus de claforan 500 mg/l pentru eliminarea bacteriilor, 4 subcultivări succesive. Experimentul s-a repetat de 3 ori.

Din tumorile care s-au dezvoltat pe unele dintre explante s-au prelevat probe pentru analize histologice conform metodologiei standard. Secţiunile de 10–12µm grosime au fost colorate cu hematoxilină Erlich şi analizate la microscopul MC1. Evidenţierea compuşilor opinici din ţesutul vegetal transformat s-a realizat prin cromatografie în strat subţire (TLC) pe plăci de silicagel Merck (Kieselgel 60F 2511) a extractelor vegetale. Developarea s-a făcut cu un amestec de metanol-alcool n-butilic/acetat de sodiu 1M (15/1/4). Colorarea s-a făcut cu ninhidrină 0,3 % în acetonă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Tabelul 1 reprezintă schematic reactivitatea diferenţiată a clonelor analizate în funcţie de condiţiile experimentale şi tulpinile bacteriene folosite. Ca o primă constatare menţionăm că o parte din explantele infectate (45 % în cazul explantelor de tulpină şi 30 % în cazul celor de frunză) au dezvoltat tumori, la locul infecţiei, cu tulpinile sălbatice de *A. tumefaciens* (A_6 şi C_{58}), după cca trei săptămâni de la inoculare (fig. 1 a, b, c). În cazul tulpinii K_1 procentul explantelor cu răspuns a fost ceva mai scăzut (25 %), dar prezent la ambele specii de plop investigate (fig. 1 d). Un fenomen interesant este apariţia de tumori secundare pe explant, la distanţă de locul infecţiei, ceea ce sugerează o migrare a bacteriilor în ţesutul vegetal şi păstrarea însuşirilor de virulenţă ale acestora. Aspectul a fost relevat şi în secţiunile histologice prin ţesutul tumoral şi segmentele de lăstar adiacente tumorii. Unele explante infectate cu tulpina *A. tumefaciens* C_{58} au format la nivelul zonei infectate buchete de lăstari modificaţi, teratoame, fără o diferenţiere evidentă de calus tumoral (fig. 2 d).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 1 – Diferențierea de țesut tumoral pe variate tipuri de explante de la clonele experimentate: infecție cu tulpini de octopinică de tip sălbatic A_6 (a, b, c) și A_6 modificată genetic (pTi ocs$^-$Km^R) *Atumefaciens:* (d) (Tumour tissue differentiation on the various types of explants of the experimented clones induced by *A. tumefaciens* infection of wild type A_6 (a, b, c) and genetical modified A_6 strain (pTi ocs$^-$ Km^R (d)

a – țesut tumoral pe explant de tulpină de plop, clona 4.16 (tumour tissue induced by A_6 strain on the stem of 4.16 clone);

b – țesut tumoral pe explant de frunză, clona 3.4 (tumour tissue induced by A_6 strain on the leaf of the 3.4 clone);

c, d – țesut tumoral pe explant de tulpină, clona 4.3 (tumour tissue induced on the 4.3 clone by A_6 strain (c) and K_1 strain (d).

Scanned with OKEN Scanner

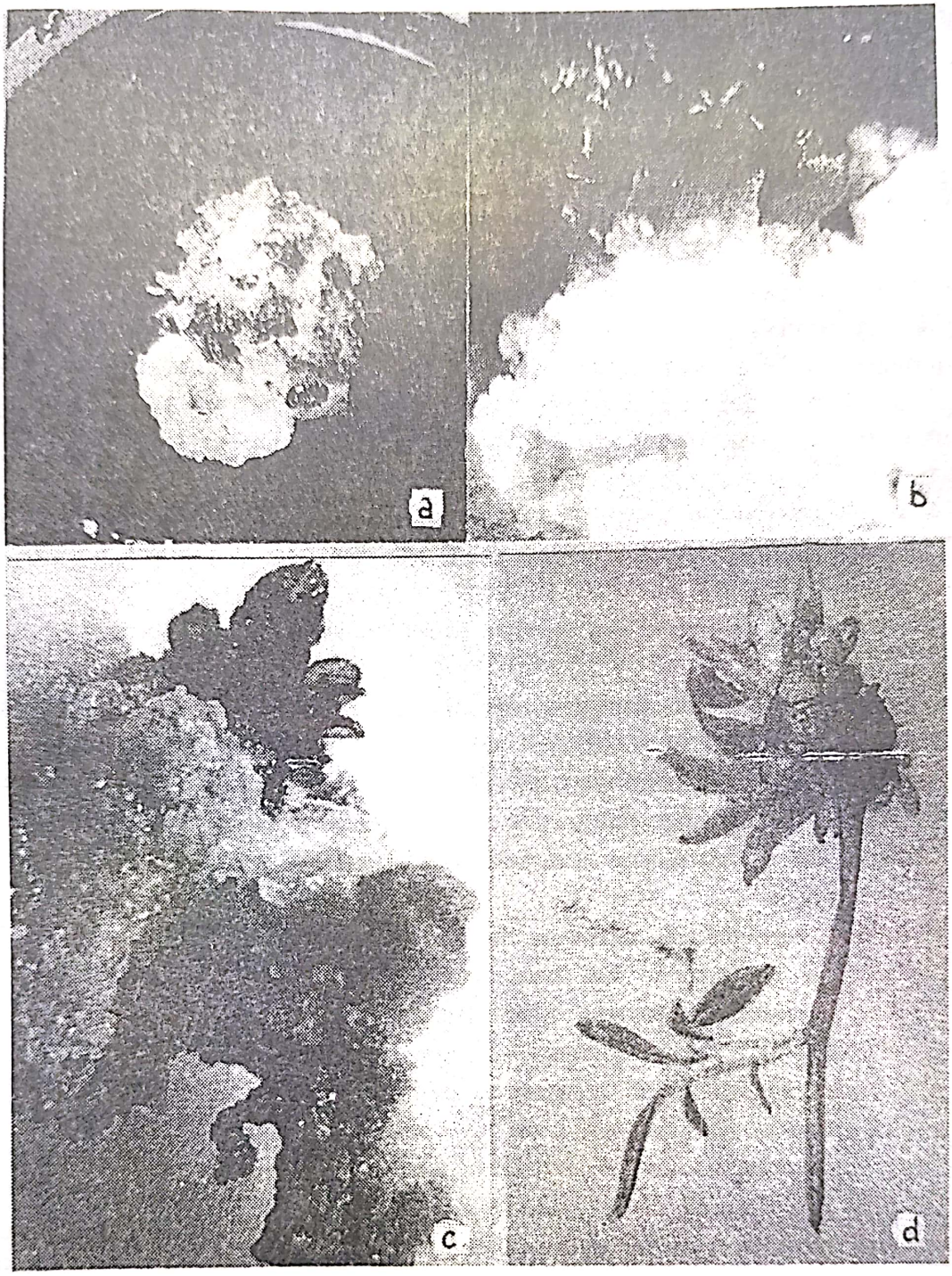


Fig. 2 – Diferenţierea de lăstari cu aspect modificat din ţesut tumoral (a, b, c) sau direct din explant (d) în urma infecţiei cu tulpina C_{58} de *A. tumefaciens* (*A. tumefaciens* C_{58} strain induced abnormal shoots from the tumour tissue (a, b, c) and directly from the infection areas of the explant (d).

Tumorile detaşate de pe explante şi transferate în continuare pe mediu fără hormoni au continuat să prolifereze, ceea ce confirmă prezenţa în celula vegetală a plasmidei Ti de la *A. tumefaciens* şi care îi conferă autonomie faţă de hormoni (auxine, citokinine). In funcţie de clona şi de tulpina bacteriană utilizată tumorile

Scanned with OKEN Scanner

diferenţiat lăstari sau rădăcini, astfel: în cazul tulpinii C_{58} a predominat formarea de lăstari, în general anormali, iar în cazul celei de tip A_6, formarea de rădăcini.

Tumorile induse de tulpina bacteriană K_1 ce are inserată, în plasmida Ti, gena de rezistenţă la kanamicină npt II ($pTiA_6Km^R$) au continuat să crească şi după subcultivarea lor pe medii suplimentate cu kanamicină în doze mari (50 mg/l) doze la care tumorile obişnuite nu mai proliferează şi treptat se necrozează (fig. 2 a).

Proliferarea celulară pe mediul selectiv menţionat demonstrează transferul genei de rezistenţă la kanamicină în celulele de plop, transfer mediat de plasmida Ti de la *A. tumefaciens*. În plus, la nivelul ţesutului tumoral rezistent la kanamicină s-au dezvoltat două tipuri de lăstari:

a – lăstari normali, care au diferenţiat rădăcini numai pe medii lipsite de kanamicină (ca factor de selecţie) şi care provin probabil din celule netransformate ale tumorii;

b – lăstari cu morfologie anormală, scurt-nodaţi suculenţi de culoare verde pal, frunze cu aspect particular şi care prezintă dificultăţi la înrădăcinare (fig. 2 b, c).

Lipsa înrădăcinării este de aşteptat în cazul lăstarilor ce conţin gene oncogene (în cazul de faţă cyt^+ sau aux^+) din cauza prezenţei citokininei, de obicei inhibitoare a înrădăcinării (Peerbolte şi colab., 1986). Diferenţierea celor două tipuri de lăstari din acelaşi ţesut tumoral este un argument pentru ideea că tumorile de tip crown-gall sunt formate dintr-un mozaic de celule normale şi transformate.

Testele pentru opine au fost pozitive în cazul lăstarilor de tipul B şi respectiv al ţesutului tumoral din care ei s-au dezvoltat ceea ce confirmă eficienţa transformării genetice a celulelor de plop prin metodologia utilizată. Eficienţa transformării genetice a fost dependentă de genotip, clonele hibride (4.16, 4.3) fiind mai sensibile la infecţia cu *A. tumefaciens* şi inducerea de tumori.

Observaţiile la nivel macroscopic asupra iniţierii şi evoluţiei ţesutului tumoral indus în urma infecţiilor cu tulpini de *Agrobacterium* de tip sălbatic sau modificate genetic au fost însoţite de studii histologice. Scopul acestora a fost evidenţierea posibilelor modificări induse la nivel celular ca urmare a stresului determinat de infecţia bacteriană, a tipului şi naturii acestor modificări. S-a evidenţiat astfel că ţesutul tumoral se caracterizează prin procese de proliferare şi citodiferenţiere intense care se desfăşoară dezorganizat şi nerestrictiv, graţie unor mecanisme moleculare proprii ce privesc biogeneza endogenă de fitohormoni (auxine/citochinine), ca şi a unor metaboliţi secundari utili creşterii şi diviziunii celulare. Ţesutul tumoral prezintă astfel încă din fazele iniţiale ale formării sale un aspect heterogen, caracterizându-se printr-un mozaic de tipuri de celule aflate în faze variate ale citodiferenţierii. Astfel, alături de celulele meristematice de regulă grupate în centre meristematice (meristemoizi) sunt prezente elemente traheidale ce provin de la acestea. Cel mai adesea apar sub forma unor noduli xilematici voluminoşi delimitaţi de un strat de celule de tip cambial: sunt prezenţi atât în zonele periferice cât şi în cele centrale, conferind ţesutului un aspect morfologic particular şi o consistenţă dură (fig. 3); în zonele periferice au fost semnalate primordii organogene (ale viitorilor lăstari sau rădăcini).

Scanned with OKEN Scanner

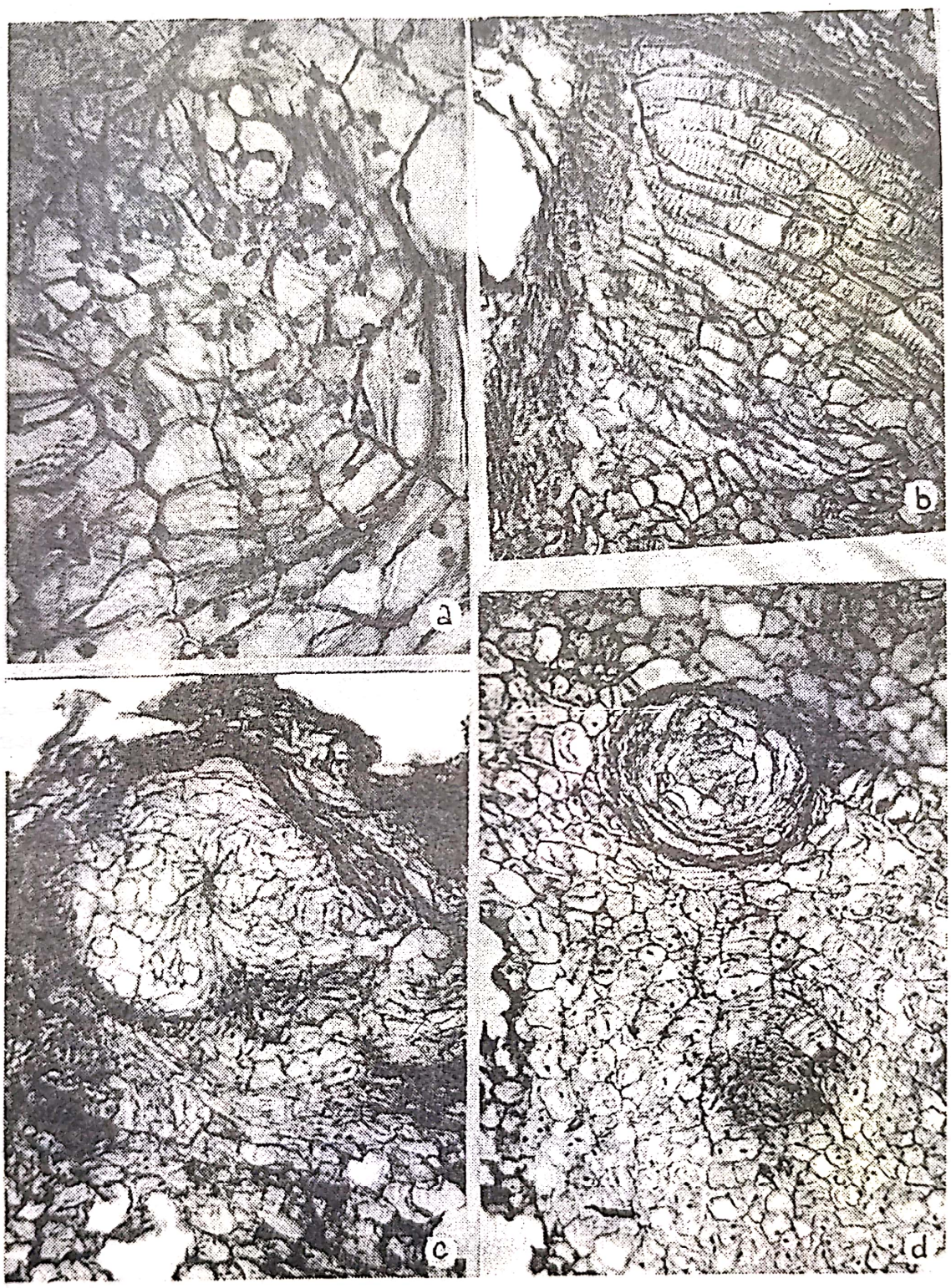


Fig. 3 – Aspecte histologice în ţesutul tumoral indus prin infecţia cu *A. tumefaciens* (Histological aspects of the tumour tissue induced by the experimental infections with wild and genetical modified *A. tumefaciens* strains) a – Meristemoid (Meristemoid); b – Noduli xilematici (Xylematic nodules); c – Nodul xilematic delimitat de un ţesut de tip cambial (Xylematic nodule delimited by the cambial layer of cells); d – Aspect general cu evidenţierea unor zone de diferenţiere a nodulelor xilematice (General aspect of tumour tissue including areas of xylematic nodules differentiation)

Scanned with OKEN Scanner

În experimentul nostru nu s-au evidenţiat diferenţe esenţiale în ceea ce priveşte structura şi evoluţia ţesutului tumoral funcţie de genotip, particularităţile morfofuncţionale ale tipului de ţesut folosit ca inocul (tulpină, mezofil foliar, peţiol) şi tulpina bacteriană experimentată (sălbatică sau modificată genetic).

Analiza citologică comparativă a ţesutului tumoral şi calusului de rănire din cultura *in vitro* ne permit să presupunem că starea tumorală nu implică o modificare a integrităţii informaţiei genetice ci o modificare persistentă în exprimarea acestei informaţii, deci dezvoltarea tumorală la plante pare să fie de fapt o diferenţiere anormală. Mecanismele fundamentale ce stau la baza transformării tumorale şi a citodiferenţierii normale sunt asemănătoare ambele depinzând pentru exprimare de activitatea selectivă şi de represia genelor.

Asocierea acestor observaţii cu studii electronomicroscopice va permite înlelegerea, cel puţin în parte, a unora dintre cauzele ce determină aspecte particulare ale proceselor de citodiferenţiere şi morfogeneză în ţesutul tumoral comparativ cu celulele calusului de rănire.

Rezultatele experimentale prezentate în lucrarea de faţă ne permit să apreciem că protocolul de lucru utilizat permite introducerea unor gene străine în celulele de plop tremurător şi regenerarea de plante transformate genetic. Se impune însă utilizarea de vectori dezarmaţi sau a vectorilor binari în transferul de gene pentru a evita dezvoltarea de ţesut tumoral. De asemenea, necesită multe investigaţii interacţia genotipului gazdă cu vectorul plasmidial întrucât de această interacţie depinde succesul penetrării în celula gazdă a genelor din segmentul ADN-T al plasmei Ti (sau Ri).

O alternativă pentru transformarea clonelor de plop, cu prespective mari, o oferă tehnicile de transfer direct de gene (ADN) prin electroporare şi mai ales prin bombardament cu particule accelerate (acoperite cu ADN). În cazul electroporării apar deocamdată dificultăţi atât în selecţionarea celulelor transformate cât şi în posibilitatea de regenerare prin sistemul celule/protoplaşti doesebit de dificil la speciile lemnoase. Rezultate recent obţinute pe specii ierboase referitoare la posibilitatea transferului direct de gene în ţesuturi intacte sau ţesut calusal prin electrotransfecţie, reprezintă o alternativă promiţătoare de a depăşi aceste inconveniente. Cât priveşte tehnica biolistică, aceasta a fost folosită cu succes în obţinerea de plante transgenice de plop (McCown şi colab., 1992), dar aplicarea ei este limitată din cauza costurilor ridicate pentru aparatura corespunzătoare.

CONCLUZII

▼ S-a evidenţiat transferul de gene mediat de *Agrobacterium* în genomul plopului prin formarea de ţesuturi tumorale sau de teratoame ocs^+ sau nos^+ în prezenţa tulpinilor de tip sălbatic A_6 şi C_{58} de *A. tumefaciens*.

▼ S-a realizat introducerea unei gene străine (gena de rezistenţă la kanamicină) în genomul plopului tremurător, utilizând ca vectori plasmide Ti de la *A. tumefaciens*; s-a demonstrat funcţionarea acestei gene prin creşterea ţesutului

Scanned with OKEN Scanner

tumoral pe mediu selectiv şi prin testul opinelor prezente în lăstarii regeneraţi din ţesutul tumoral.

▼ Observaţiile histologice nu au evidenţiat diferenţe în ceea ce priveşte structura şi evoluţia ţesutului tumoral în funcţie de genotip, particularităţile morfo-funcţionale ale ţesutului folosit ca sursă de inocul şi tulpina bacteriană experimentală (tulpina sălbatică sau modificată genetic). Asocierea acestor observaţii cu studii electronomicroscopice va permite înţelegerea, cel puţin în parte, a unora dintre cauzele ce determină aspecte particulare ale citodiferenţierii în ţesutul tumoral.

GENES TRANSFER IN POPULUS USING WILD AND GENETIC MODIFIED STRAINS OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

SUMMARY

Two clones of *Populus tremula* cv. Ahle (3.2 and 3.4) and three clones of the hybrid *P. tremula* x *P. tremuloides* cv. Munden (4.3, 4.16, 4.18) have been tested *in vitro* for their susceptibility to different *Agrobacterium tumefaciens*: two wild-type strains (A_6 and C_{58}) and K_1 an own derivative strain from A_6 carring a neomicine phosphotransferase gene (npt II) originally from Tn_5 (pTi OCS^+Km^R).

Strain C_{58} proved to be the most virulent inducing both teratoma and calluses formation. The number and size of resulting tumours have been dependent on Populus genotypes, the clones of hybrid aspen being more susceptible than clones of *P. tremula*.

Tumours with regenerated shoots of K_1 strain inoculated clones were subcultured on selective medium containing kanamycin (50 mg/l). Their growth on this medium as well as the opine test analysis confirmed the genetic transformation *A. tumefaciens* mediated of aspen tissue.

BIBLIOGRAFIE

Ahuja M. R., 1988 – Genetic transfer in forest trees. Genetic Manipulation of Woody Plants. J. W. Hanover and D. E. Keathley (Eds.) Plenum Press, New York; 25–41;

Ahuja M. R., 1991 – Woody plant biotechnology. Perspectives and limitations. Woody Plant Biotechnology. M R. Ahuja (Ed.), New York; 1–9;

Confalonieri M., Balestrazzi A., Bisoffi S., 1994 – Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 13: 156–261;

Dekesyer B. A., Clack B., Riet M. U., Habets, M. E., Montague, M. C., Caplan, A. B., 1990 – Transient gene expression in intact and organized rice tissue. The Plant Cell, 2; 591–602;

De Padua V.L.H., Gusmao I., Quoirein M., De Oliviera D. E. 1994 – Rice (*Oryza sativa* L.) genetic transformation through electroporation of intact tissue. VII-th Int. Congr. of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze; S-7-100;

Fillati J. J., McCown B. H., Sellmer J., Haising B. E., 1986 – The introduction and expression of a gene conferring tolerance to the herbicide glyphosphate in *Populus* NC-5339, Proc. TAPPI Res. and Dev. Conf. Raleigh, NC; 83–84;

Fillati J. J., Sellmer J., McCown B., Haissing B. E., Comai L., 1987 – *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet., 206; 192–199;

Huang Y., Dong-Ill Shin, Karnosky D., 1991 – Evindece for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Larix. Woody Plant Biotechnology Ed by Ahuja Plenum Press, New York; 233–236;

Scanned with OKEN Scanner

Klopfenstein N. B., Thornburg R. W., McNabb H. S., jr., Hall R. B., Hart E. R., Ghun Y. W., Kernan A., Shi N. Q., 1991 – Transformation of *Populus* from system development to field plant ings. In: Woody Plant Biotechnology, M. R. Ahuja (Ed.) New York; 257;

McCown B. H., McCabe D. E., Russel D. R., Robinson D. J., Barton K. A., Raffa K. F., 1992 –Stable transformation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. Plant Cell Rep., 9; 590–594;

McCown B. H., 1991 – Genetic transformation of trees vila direct gene transfer. In: Woody Plant Biotechnology, M. R. Ahuja (Ed.), New York; 207–211;

Michler C. M., Haissig B. E., 1988 – Increased herbicide tolerance to in vitro selected hybrid poplar. Somatic Cell Genetics of Woody Plants. M. R. Ahuja (Ed.), Kluwer Academic Pubs., Dordrecht, Boston, London; 183–188;

Murashige T., Skoog F., 1962 – A revised medium rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15; 473–497;

Parsons T. J., Sinkar V. P., Stettler R. F., Nester E. W., Gordon M. P., 1986 – Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*, Bio/Technology, 4; 533–536;

Peerbolte R., Leenhouts K., Hooykaas-Van Slogteren G. M. S., Hoge J. H. C., Wullems G. J., Schilperoort R. A., 1986 – Clones from a shooty tobacco crown-gall tumour I deletions, rearrangements and ampliffications resulting in irregular T-DNA structures and organisations. Plant Mol. Biol., 7; 265–284;

Reimenchneider D. E., Haissig B. E., Sellmer J., Fillati J. J., 1988 – Expression of on herbicide tolerance gene in young plants of a transgenic hybrid poplar clone. Somatic Cell Genetic of Woody Plants M. R. Ahuja (Ed.), Kluwer Acad. Pubs. Dordrecht, Boston, London; 73–80;

Reimenschneider D. E., Haissig B. E., 1991 – Producing herbicide tolerant *Populus* using transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* C_{58}. A summary of recent research in Woody Plant Biotechnology, R. Ahuja (Ed.-), New York; 247–263;

Sellmer J. C., Mc Cown B. N., 1989 – Transformation in *Populus* spp. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 9, „Plant Protoplasts and Genetic Engineering II". Y. P. S. Bajaj (Ed.), Springer-Verlag, Berlin: 155–172;

Welander M., Maheswaran G., 1991 – Regeneration and transformation experiments in apple. Woody Plant Biotechnology Ed by M. R. Ahuja Plenum Press New York: 237–245.

Scanned with OKEN Scanner

MUTAGENEZA ŞI RADIOSENSIBILITATEA LA DIFERITE POPULAŢII DE *PSEUDOTSUGA MENZIESII* (MIRB.) FRANCO VAR. *MENZIESII* (DUGLAS-VERDE)

G. C. CORNEANU[1], MIHAELA CORNEANU[1], Gh. F. BORLEA[2], I. BLADA[3], C. BĂDICA[1], C. FRANGOPOL[4]

Originar din vestul Americii de Nord, unde vegetează între 35° şi 55° latitudine nordică, duglasul-verde (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*) ocupă suprafeţe întinse din Columbia Britanică (Canada), până în California şi New Mexico (S.U.A.) şi de la ţărmul Oceanului Pacific până spre Munţii Stâncoşi, fiind întâlnit, de regulă, ca specie de amestec şi, mai rar, în arborete pure, realizând un optim de vegetaţie între 100–900 m altitudine (Kuiper, 1988). Varietatea *menziesii* este întâlnită în zonele de litoral şi din ansamblul Cascadelor – Sierra Nevada, precum şi în zona interioară a Columbiei Britanice (J. W. Wright, 1965). Duglasul-verde este de asemenea mult plantat în nord-estul Statelor Unite, Insulele Britanice, Noua Zeelandă şi Europa (Wright, 1965).

Introdus cu cca 170 ani în Europa, iniţial în Anglia de către David Douglas (1827), această specie s-a bucurat de o atenţie deosebită şi la noi în ţară, unde a fost introdus după anul 1890 (Enescu, 1975). Suprafaţa ocupată de duglas în România este de cca 14 280 ha, arborete de duglas găsindu-se în Transilvania în raza Ocoalelor Silvice Aleşd, Feleac, Harghita, Beiuş, în zona Braşovului (Râşnov, Săcele), în Banat în bazinul râului Nădrag, în Moldova la Putna, Poiana Doamnei, Cacica, Bacău, în Oltenia în pădurea Cobia ş.a. Rapiditatea de creştere, productivitatea excepţională şi însuşirile tehnologice ale lemnului conferă duglasului-verde atribute de mare importanţă şi perspective pentru extinderea culturii sale în genofondul naţional (Haralamb, 1956; Enescu, 1975).

[1] Universitatea din Craiova
[2] S.C.S. Pădurea-Verde
[3] I.C.A.S. Bucureşti
[4] S.C. Electroputere S.A.

Scanned with OKEN Scanner

În diferite ţări, inclusiv în România, s-a urmărit comportarea în cultură a unor provenienţe de duglas-verde. S-a constatat o reacţie diferită, dependent de genotipul (populaţia) considerată, condiţiile de mediu din zona de proveniență şi cele din zona în care s-a efectuat experimentul (Wright, 1965; Enescu, 1975; Corneanu et al., 1990 ş.a.). Astfel Schober şi Meyer (1955) au testat aclimatizarea în Germania a 32 provenienţe de dulgas-verde, originare din cinci regiuni diferite (Colorado, Oregonul de Vest, partea de sud-vest a statului Washington, centrul regiunii Cascadelor din statul Washington şi Valea Fraser din Columbia Britanică), care au fost plantate în şase locuri diferite din Germania. Experimentul a relevat diferenţe semnificative între regiuni, dar nu între provenienţele din aceeaşi regiune. În România există, de asemenea, rezultate privind comportarea în cultură a unor provenienţe diferite de dulgas-verde (Enescu, 1975; Corneanu et al., 1990 ş.a.).

Cercetările din prezentul experiment au avut drept scop:

- stabilirea capacităţii de adaptare a unor populaţii de duglas-verde, originare din diferite regiuni de pe coasta vestică a Americii de Nord, la condiţiile din România;
- stabilirea radiosensibilităţii comparate a diferitelor populaţii situate la altitudine, latitudine şi depărtare diferite de coasta Oceanului Pacific;
- depistarea unor mutante (sau radiomorfoze) induse prin iradierea cu radiaţii X a seminţelor uscate.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

Au fost utilizate seminţe aparţinând la 16 populaţii de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb,) Franco var. *menziesii*, originare de la Statsekovenes Planteavlsstation 3050 Humlebaek; două populaţii provenite de la cea mai nordică latitudine fiind pierdute încă de la începutul experimentului (Columbia Britanică, Alexandria, 52°41′30″ lat N, 122°26′ long W, 580–730 m alt., şi Columbia Britanică, Clemina, 52°35′ lat N, 119°05′ long W, 885 m alt.). Cele 14 populaţii rămase şi analizate în acest experiment provin din zone ecologice diferite, de pe teritoriul statelor Columbia Britanică, Washington, Oregon şi California, situate între 52°35′–38°50′ lat N; 125°03′–119°05′ long W şi 17–1 600 m altitudine (figura 1, tabelul 1).

Seminţele uscate au fost iradiate acut (doză unică) cu radiaţii X emise de un aparat tip THX-250, la un debit al dozei de 2 Gy/min., utilizând dozele 0, 20, 40, 60, 80 şi 100 Gy. Parametrii de iradiere au fost: 155 kV, 5 mA, d.f. = 600 mm, filtru 1 mm Al. După iradiere, seminţele au fost stratificate timp de 30 zile, la o

Scanned with OKEN Scanner

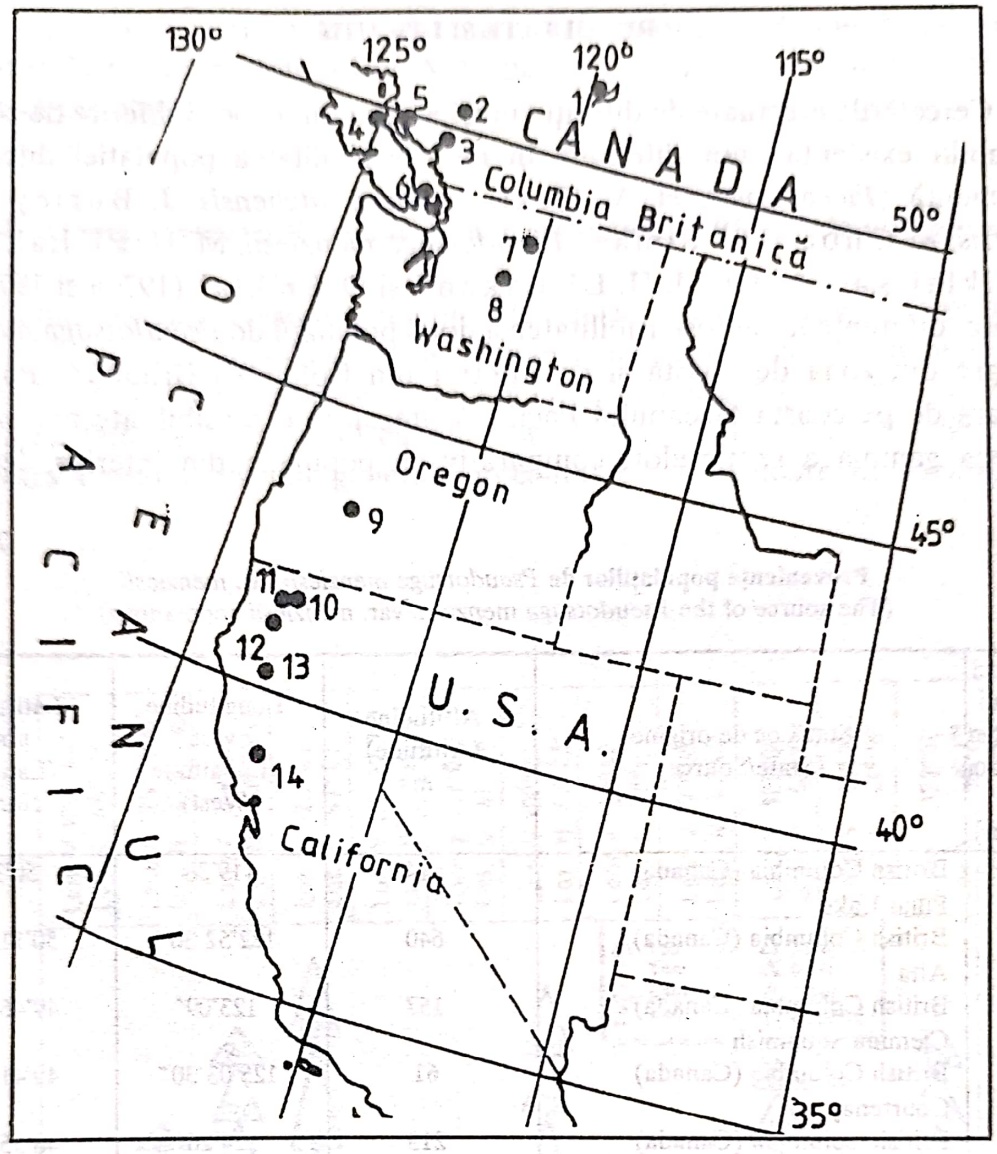


Fig. 1 – Locul de proveniență al populațiilor de duglas-verde
(Provenance sites of Douglas-fir populations)

temperatură de 0°–4°C, după care au fost semănate în pătrat latin(4 x 4) la S.C.S. Pădurea Verde (Timişoara). Puieţii în vârstă de 4 ani au fost transplantaţi la locul definitiv (după proveniență şi variantă experimentală), pe un teren uniform din punct de vedere al condiţiilor de mediu, la S.C.S. Pădurea Verde (climat continental, altitudine scăzută, câmpie).

Timp de 9 ani, a fost stabilit ritmul anual de creştere, numărul de etaje per plantă, lungimea frunzelor (valori interpretate statistic), stabilindu-se răspunsul diferit al celor 14 populaţii (controlul şi variantele experimentale) la condiţiile climatului continental şi de altitudine joasă (câmpie) din România (Timişoara), precum şi radiosensibilitatea lor diferită. De asemenea, au fost identificate unele mutaţii (radiomorfoze) care au afectat diferite caractere calitative sau cantitative.

Scanned with OKEN Scanner

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Cercetările efectuate de diferiţi autori asupra unor specii diferite de conifere au stabilit existenţa unor diferenţe în radiosensibilitatea populaţiei diferite ca proveniență (*Picea abies*, H. V. Tralau; *Picea sitchensis*, J. Burley; *Pinus silvestris*, K. Ohba şi W. Simak; *Pseudotsuga menziesii*, M. H. El-Lakany şi O. Sziklai ş.a.). Astfel, M. H. El-Lakany şi O. Sziklai (1970a şi 1970b) au constatat diferenţe în radiosensibilitatea a două populaţii de *Pseudotsuga menziesii* originare din zona de coastă şi de interior din Columbia Britanică. Populaţia originară de pe coasta Oceanului Pacific a prezentat o sensibilitate mai mare la iradierea gamma a seminţelor, comparativ cu populaţia din interior, fenomen

Tabelul 1

Proveniența populaţiilor de *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*
(The source of the *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* populations)

Numărul codului populaţiei (population cod number)	Stat/Loc de origine (State/Source)	Altitudine (Altitude) m	Longitudine vest (Longitude West)	Latitudine nord (Latitude North)
1	British Columbia (Canada) Pillar Lake	914	119°38′	50°35′
2	British Columbia (Canada) Alta	640	122°52′30″	50°11′30″
3	British Columbia (Canada) Clemina Squamish	157	123°09′	49°46′40″
4	British Columbia (Canada) Courtenay	61	125°03′30″	49°41′45″
5	British Columbia (Canada) Caycuse	213	124°26′	48°55′25″
6	British Columbia (Canada) Sooke	46	123°44′	48°24′
7	Washington (U.S.A.) Okanogan Co. Twisp	732–853	120°24′	48°23′
8	Washington (U.S.A.) Chellan Co. Chixaukum	549	120°44′	47°41′
9	Oregon (U.S.A.) Douglas Steam Boat	1600	122°31′	43°22′
10	California (U.S.A.) Siskiyou Seyad Valley	732–853	123°00′	41°48′
11	California (U.S.A.) Siskiyou, Scott Bar	975–1036	123°06′	41°44′
12	California (U.S.A.) Siskiyou, Sawyers Bar	1436	123°09′	41°16′
13	California (U.S.A.) Shasta, Wildwood	1189	123°00′	40°23′
14	California (U.S.A.) Lake, Lower Lake	945	122°42′	38°50′

Scanned with OKEN Scanner

explicat pe baza diferenţelor existente între valorile volumului cromosomal interfazic (ICV) şi ale cantităţii de ADN pe nucleu şi pe cromosom înregistrate la cele două populaţii.

A. Comportarea în România a unor proveniențe diferite de duglas-verde

Comportarea şi creşterea puieţilor de duglas-verde, de diferite proveniențe, în condiţiile din România (regiune de câmpie, climat continental) este dependentă atât de caracteristicile staţionale ale regiunii de proveniență (altitudine, latitudine, depărtarea faţă de litoralul Oceanului Pacific ş.a.), cât şi de doza de radiaţii administrată seminţelor. În general, procentul de acomodare la condiţiile din

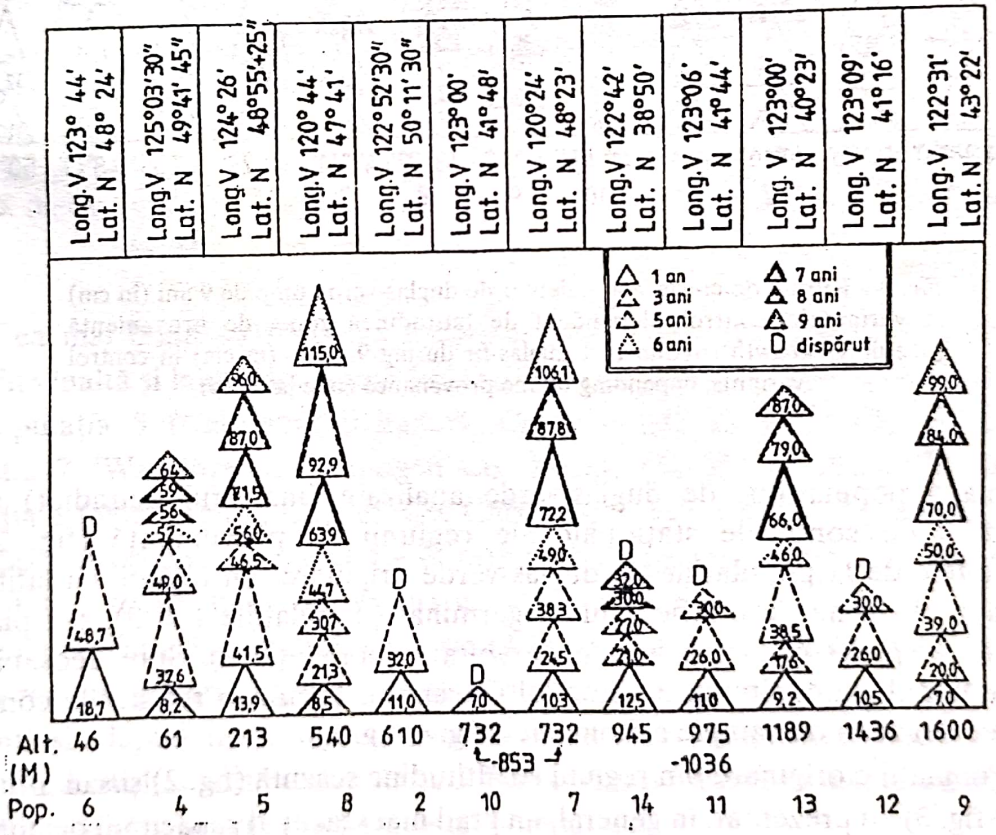


Fig. 2 – Ritmul de creştere al puieţilor de duglas-verde timp de 9 ani (în cm) la variantele control, dependent de altitudinea zonei de proveniență (Seedling growth rhythm of Douglas-fir during 9 years (in cm) in control variants, depending on the provenance zone altitude)

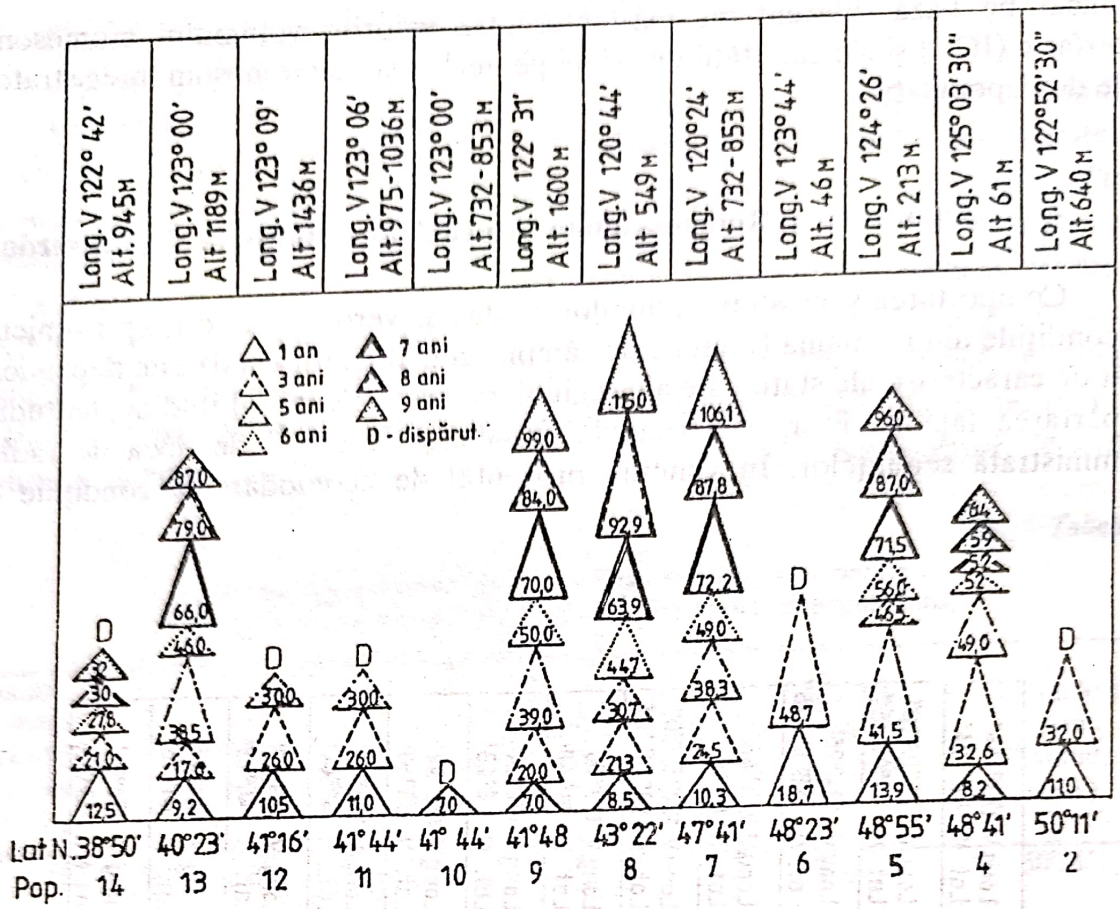


Fig. 3 – Ritmul de creştere al puieţilor de duglas-verde timp de 9 ani (în cm) la variantele control, dependent de latitudinea zonei de proveniență (Seedlings growth rhythm of Douglas-fir during 9 years (in cm) in control variants, depending on the provenance zone latitude)

România a populaţiilor de duglas-verde analizate (martorul neiradiat) a fost dependent de condiţiile staţionale ale regiunii de proveniență (fig. 2, fig. 3).Seminţele de la populaţiile de duglas-verde originare din regiuni cu latitudine nordică şi din zone de interior, nu au germinat (populaţiile 1 şi 3), sau plantele rezultate au pierit în primii ani de dezvoltare (populaţia 2). Spre deosebire de acestea, populaţia 4, situată pe litoralul Oceanului Pacific, a rezistat la condiţiile climatice din zona de câmpie a României (fig. 4, fig. 5).

Populaţiile originare din regiuni cu altitudine scăzută (fig. 2) şi/sau latitudine sudică (fig. 3) au prezentat, în general, un grad mai scăzut al capacităţii de adaptare la condiţiile de câmpie din România. Astfel, varianta martor de la populaţiile 2 şi 6 din Columbia Britanică (Alta, respectiv Sooke), originare din regiuni cu altitudine scăzută (640 m, respectiv 46 m), deşi din regiuni cu latitudine nordică (tabelul 1 fig. 1) totuşi au pierit după trei ani de vegetaţie.

Menţionăm faptul că în cazul populaţiei originare de la Sooke (populaţia 6) nu a supravieţuit nici un exemplar din toate variantele experimentale şi de la martor, mai mult de 3 ani de la începerea experimentului (fig. 6).

Scanned with OKEN Scanner

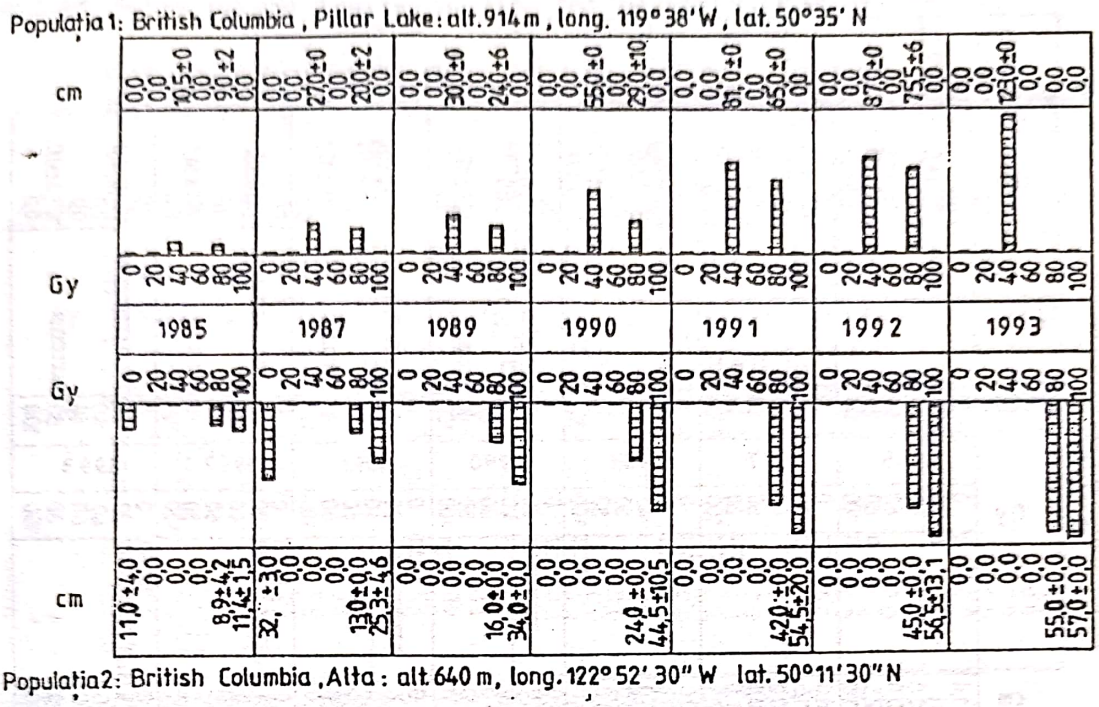


Fig. 4 – Ritmul de creştere al puieţilor de duglas-verde timp de 9 ani (în cm), dependent de doza de radiaţii X (în Gy; populaţiile 1 şi 2) (Seedlings growth rhythm of Douglas-fir during 9 years (in cm),, depending on the X-rays dose (in Gy; the 1st and 2nd populations)

Cea mai bună adaptare au prezentat populaţiile originare din locurile cu altitudine înaltă şi latitudine nordică şi/sau din regiunile de coastă. În acest grup se află populaţia 5 (Columbia Britanică, Caycuse, 213 m alt., 48°55′25″ lat N), populaţia 7 (Washington, Okanogan Co. Twisp, 732–853 m alt., 48°23′ lat N), populaţia 8 (Washington, Chellan Co. Chixaukum, 549 m alt. 47°41′ lat N; (fig. 2, fig.3). Spre deosebire de populaţia 6, originară de pe malul râului Fraser, care a manifestat o totală lipsă de adaptare (atât varianta martor, cât şi variantele iradiate), populaţia 5, originară de pe malul lacului care alimentează râul Fraser din aceeaşi regiune geografică, dar situată la o altitudine uşor superioară, a prezentat rezistenţă şi adaptabilitate la noile condiţii (fig. 6). Variabilitatea condiţiilor locale în care s-a dezvoltat natural populaţia 5 (zona lacului), a determinat o rezistenţă şi adaptabilitate superioară, comparativ cu populaţia 6.

Populaţiile 7 şi 8 originare din zona centrală a statului Washington, au prezentat cea mai bună adaptabilitate la condiţiile din România, stabilită pe baza ritmului de creştere al puieţilor timp de 9 ani. Ele au înregistrat un ritm de creştere relativ similar în perioada analizată (fig. 7). La aceste populaţii, atât la martor, cât şi la variantele iradiate, au fost înregistrate valori similare şi pentru numărul de etaje pe plantă şi pentru lungimea acelor la puieţii de 9 ani (populaţia 7: puieţii au prezentat 9,75–11,75 etaje şi ace de 23,5–24,1 mm lungime).

Scanned with OKEN Scanner

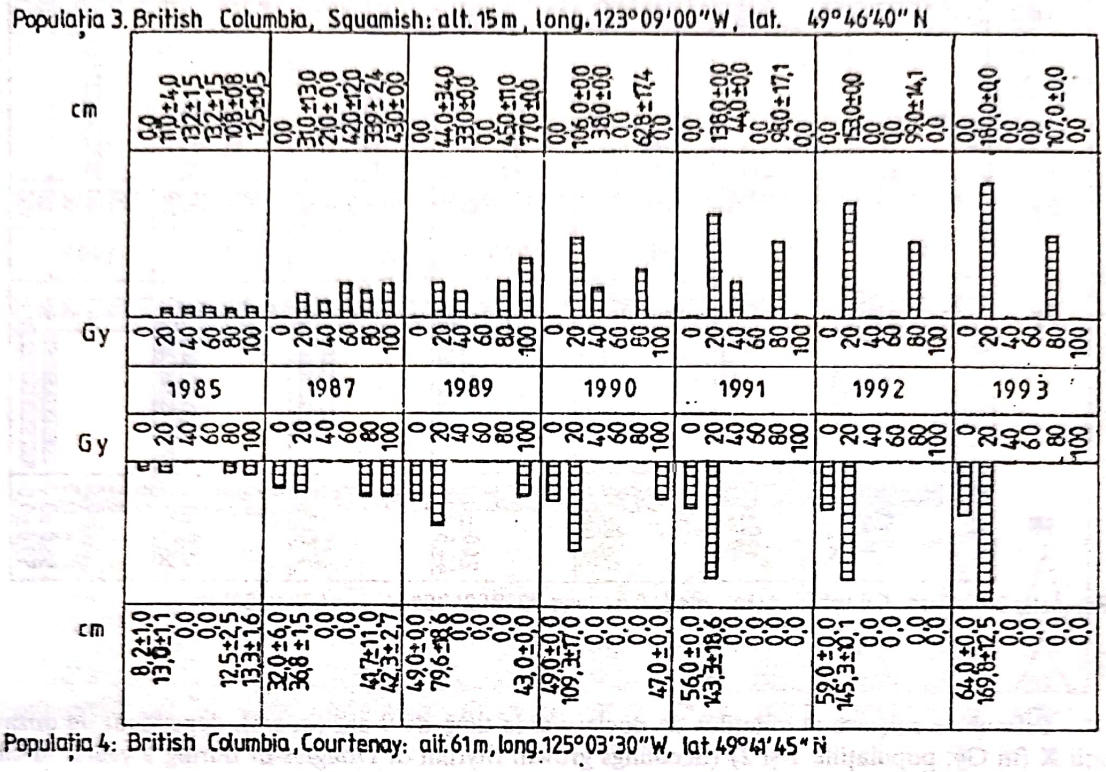


Fig. 5 – Ritmul de creştere al puieţilor de duglas-verde timp de 9 ani (în cm), dependent de doza de radiaţii X (în Gy; populaţiile 3 şi 4) (Seedling growth rhythm of Douglas-fir during 9 years (in cm), depending on the X-rays dose (in Gy; the 3rd and 4th populations)

O bună adaptare au prezentat-o şi populaţiile originare de la o latitudine sudică, dar altitudine înaltă (populaţiile 9 şi 13). Populaţia 9, originară dintr-o zonă cu păduri masive de duglas din statul Oregon (Douglas Steam Boat), situată la 1 600 m alt. şi 43°22′ lat N, a prezentat o bună adaptabilitate în România (Timişoara), atât privind martorul, cât şi variantele iradiate (fig. 8).

Populaţiile 10, 11 şi 12, originare din pădurile aflate pe malul râurilor din California (fig. 1), au prezentat (varianta martor, neiradiată), o slabă adaptabilitate în România (fig. 9). Populaţia 13, originară din masivul păduros Shasta, s-a adaptat foarte bine la condiţiile din România (fig. 10), similar ca şi populaţiile 7 şi 8 (martorul neiradiat), originare tot din masive muntoase (Baker, Vernon; fig. 8). Variantele iradiate ale acestor populaţii au prezentat o bună adaptabilitate, având un ritm de creştere superior, dozele mici de radiaţii aplicate seminţelor (20 Gy şi 40 Gy) prezentând un puternic efect radiostimulator asupra creşterii (fig. 7, fig. 10).

Scanned with OKEN Scanner

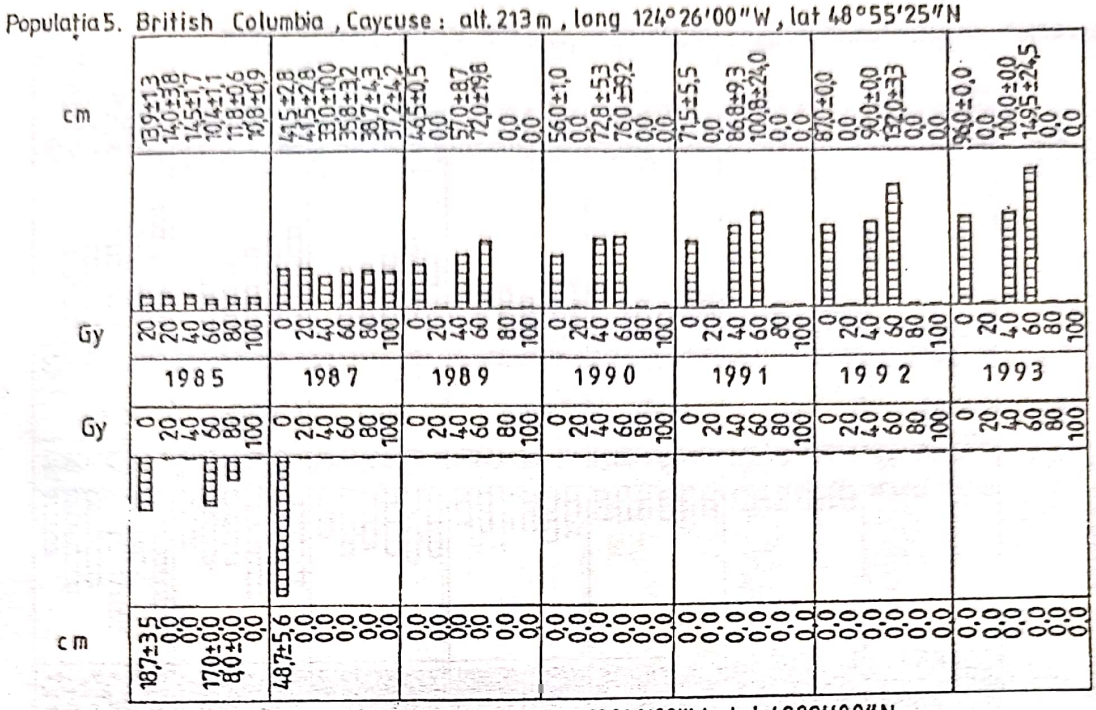


Fig. 6 – Ritmul de creştere al puieţilor de duglas-verde timp de 9 ani (în cm), dependent de doza de radiaţii X (în Gy; populaţiile 5 şi 6) (Seedlings growth rhythm of Douglas-fir during 9 years (in cm), depending on the X-rays dose (in Gy; the 5th and 6th populations)

Populaţia 14, originară din partea central-vestică a statului California, din zona lacului Lower, a înregistrat un ritm scăzut de creştere comparativ cu alte populaţii originare din alte regiuni (populaţiile 5, 7, 8, 9 şi 13).

B. Radiosensibilitatea comparată a populaţiilor de duglas-verde

Cele 14 populaţii de duglas-verde analizate au prezentat o radiosensibilitate diferită, analizată pe baza testelor de creştere. În general, dozele mici de radiaţii X aplicate seminţelor uscate (20 Gy şi 40 Gy) au prezentat efect radiostimulator, în special la populaţiile 3, 4 şi 10 (doza 20 Gy), la care înălţimea puieţilor de la variantele iradiate a depăşit net celelalte variante şi martorul neiradiat. Astfel, puieţii de 9 ani de la varianta 20 Gy, au înregistrat înălţimea de 180,0 cm (populaţia 3), 168,8 cm (populaţia 4), respectiv 142,0 cm (populaţia 10). Este demn de remarcat faptul că seminţele variantei martor de la populaţia 3 nici nu au germinat, iar în cazul populaţiei 10, martorul a dispărut după primul an.

Doza de 40 Gy aplicată seminţelor uscate a prezentat efect radiostimulator la populaţiile 1, 13 şi 14. O menţiune specială trebuie acordată populaţiei 1 (Columbia

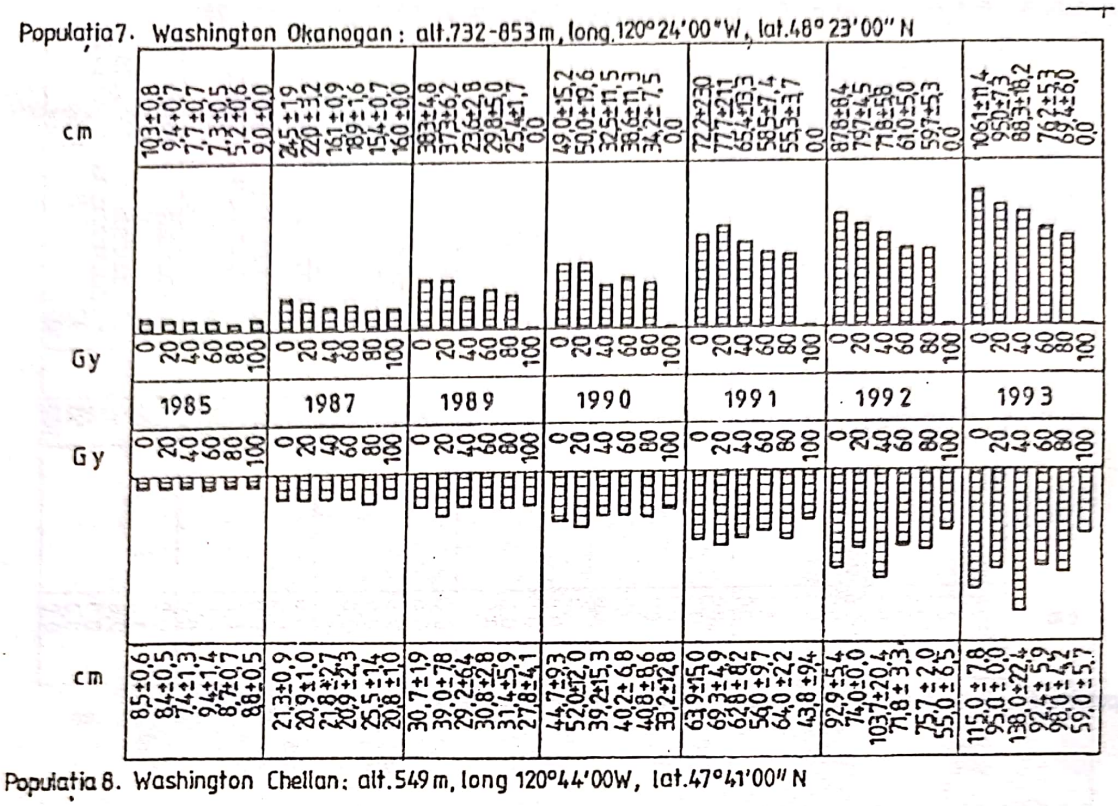


Fig. 7 – Ritmul de creştere al puieţilor de duglas-verde timp de 9 ani (în cm), dependent de doza de radiaţii X (în Gy; populaţiile 7 şi 8) (Seedlings growth rhythm of Douglas-fir during 9 years (in cm) depending on the X rays dose (in Gy; the 7 and 8 populations)

Britanică, Pillar Lake, 914 m alt., 50°35′ lat, N), la care dozele de 40 Gy şi 80 Gy au manifestat efect stimulator asupra creşterii, pe când la celelalte variante experimentale, seminţele nu au germinat sau nu au supravieţuit după germinare.

Populaţiile 1 şi 14 (extreme în lotul experimental amplasat la S.C.S. Pădurea Verde-Timişoara), nu prezintă valori pentru puieţii de 8 şi 9 ani, deoarece aceştia au dispărut din experiment (tăiaţi).

Populaţia 9, originară, de la altitudine mare (Oregon, Douglas Steamboat, 1 600 m alt., 43°22′ lat N), adaptată natural la factorii de stress a prezentat radiosensibilitatea cea mai mică (radiorezistenţă mare): varianta 100 Gy a înregistrat pentru înălţimea puieţilor de 8 ani o valoare egală cu cea a martorului (84,0 cm), iar la puieţii de 9 ani o valoare uşor inferioară martorului (83,5 cm la 100 Gy, faţă de 88,0 cm la martor; fig. 8).

Efectul radiostimulator apreciabil al dozei de 20 Gy radiaţii X, a fost înregistrat atât la populaţiile originare de la altitudine joasă şi latitudine nordică (populaţiile 3 şi 4, situate la 17 m alt. şi 49°46′40″ lat N, respectiv la 61 m alt. şi 49°41′45″ lat N, fig 5), în toţi cei 9 ani de cercetare, cât şi la populaţia 10 (California,

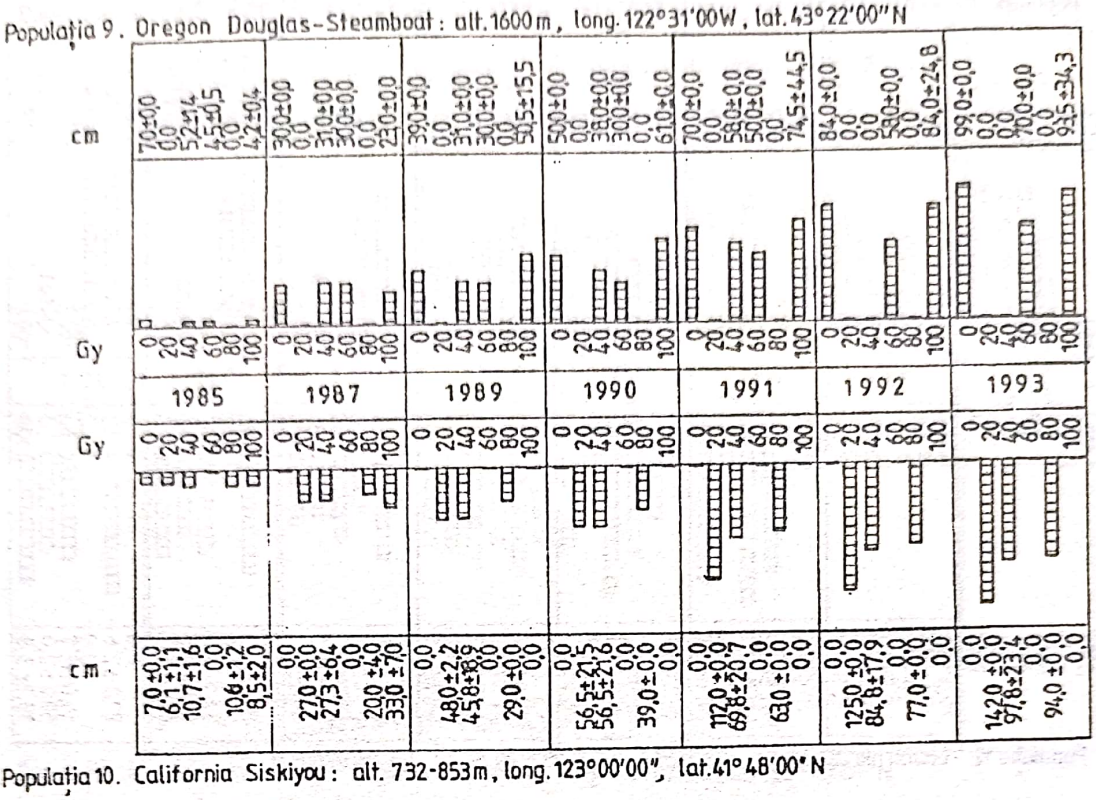


Fig. 8 – Ritmul de creștere al puieților de duglas-verde timp de 9 ani (în cm), dependent de doza de radiații X (în Gy; populațiile 9 și 10) (Seedlings growth rhythm of Douglas-fir during 9 years (in cm) depending on the X rays dose (in Gy; the 9 and 10 populations)

Siskiyou Seyad Valley) originară de la altitudine medie (732–853 m), însă de la o latitudine sudică (41°48′ lat N, fig. 8).

C. Mutageneza la populațiile de duglas-verde

În cazul unor plante care se reproduc prin semințe, inducerea mutațiilor este foarte dificilă la formele alogame, comparativ cu cele autogame. În urma tratamentului cu factori mutageni, are loc o creștere a variabilității materialului biologic, mărind astfel baza pentru selecție. La speciile de conifere, principalele mutații afectează lungimea frunzelor (acelor) și dispoziția lor pe ramuri, numărul de frunze în mănunchi, conținutul în clorofilă (mutante clorofiliene) ș.a. În afara acestor tipuri de mutații, la arbori proveniți din semințe iradiate sunt întâlnite unele modificări morfologice sub influența factorilor de mediu: fasciația lăstarilor, rădăcinilor, florilor sau fructelor; prezența de lăstari secundari între verticile sau pine; lăstari dezvoltați de la nivelul conurilor; formarea de antere pe petale și petale pe stamine ș.a. (Privalov, 1967).

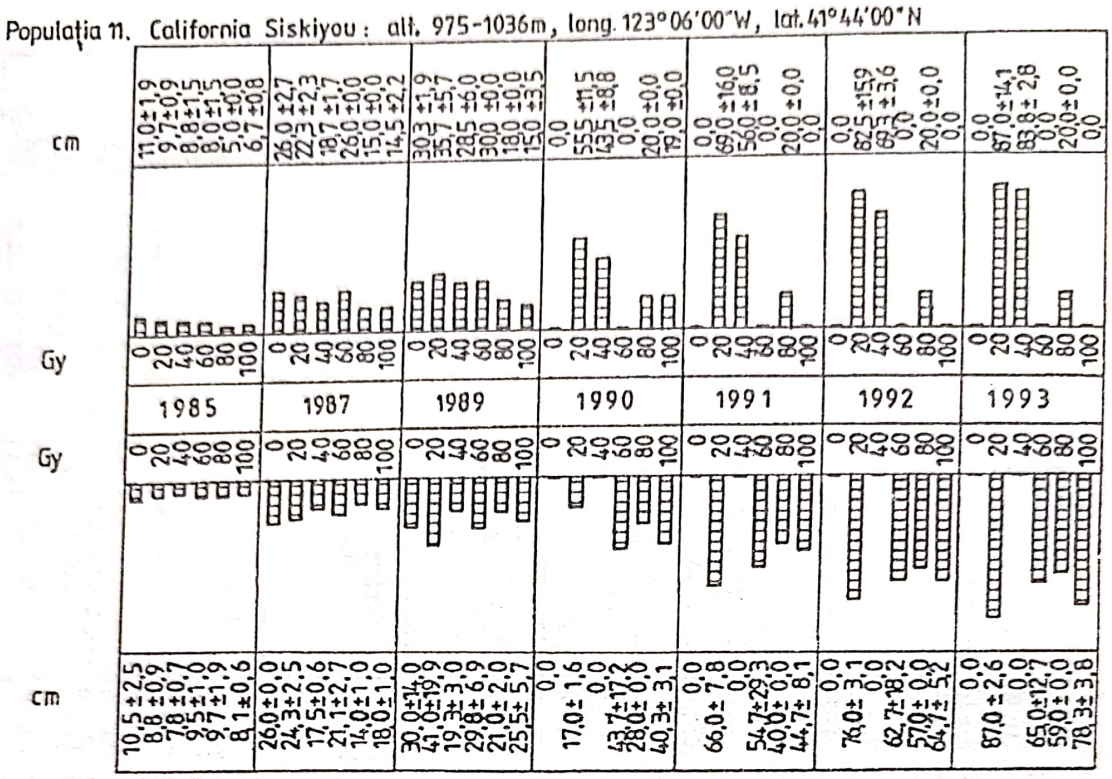


Fig. 9 – Ritmul de creştere al puieţilor de duglas-verde timp de 9 ani (în cm), dependent de doza de radiaţii X (în Gy; populaţiile 11 şi 12) (Seedlings growth rhythm of Douglas-fir during 9 years (in cm) depending on the X rays dose (in Gy; the 11th and 12th populations)

Analiza fenotipică a puieţilor de duglas-verde de la variantele iradiate din acest experiment, precum şi a unor caracteristici cantitative (ritmul de creştere. numărul de etaje pe puiet şi distanţa dintre ele, lungimea acelor şi dispoziţia lor pe ramuri, ş.a.), a permis identificarea unor mutante (radiomorfoze), care afectează diferite caractere.

a. **Ritmul de creştere** este caracteristic unei specii şi este mult influenţat de condiţiile de mediu.

Plante cu ritm înalt de creştere, caracter întâlnit la trei puieţi de la varianţa 20 Gy, populaţia 4 (Columbia Britanică, Courtenay, 61 m alt., 49°41'45" lat N). În toţi anii experimentului, puieţii consideraţi au prezentat un ritm înalt de creştere. În cel de al nouălea an, ei au prezentat 183,34 cm înălţime, 14,35 etaje de ramuri şi ace de 20,33 mm lungime, comparativ cu puieţii din aceeaşi variantă şi populaţie (129,0 cm înălţime, 13,0 etaje şi ace de 18,5 mm lungime) sau faţă de martorul neiradiat (fig. 5). Deoarece condiţiile de mediu ale experimentului au fost uniforme, iar în cadrul variantei tratate cu 20 Gy au existat două grupe distincte de puieţi, una cu ritm normal de creştere, şi respectiv alta cu ritm înalt de creştere (cu diferenţă

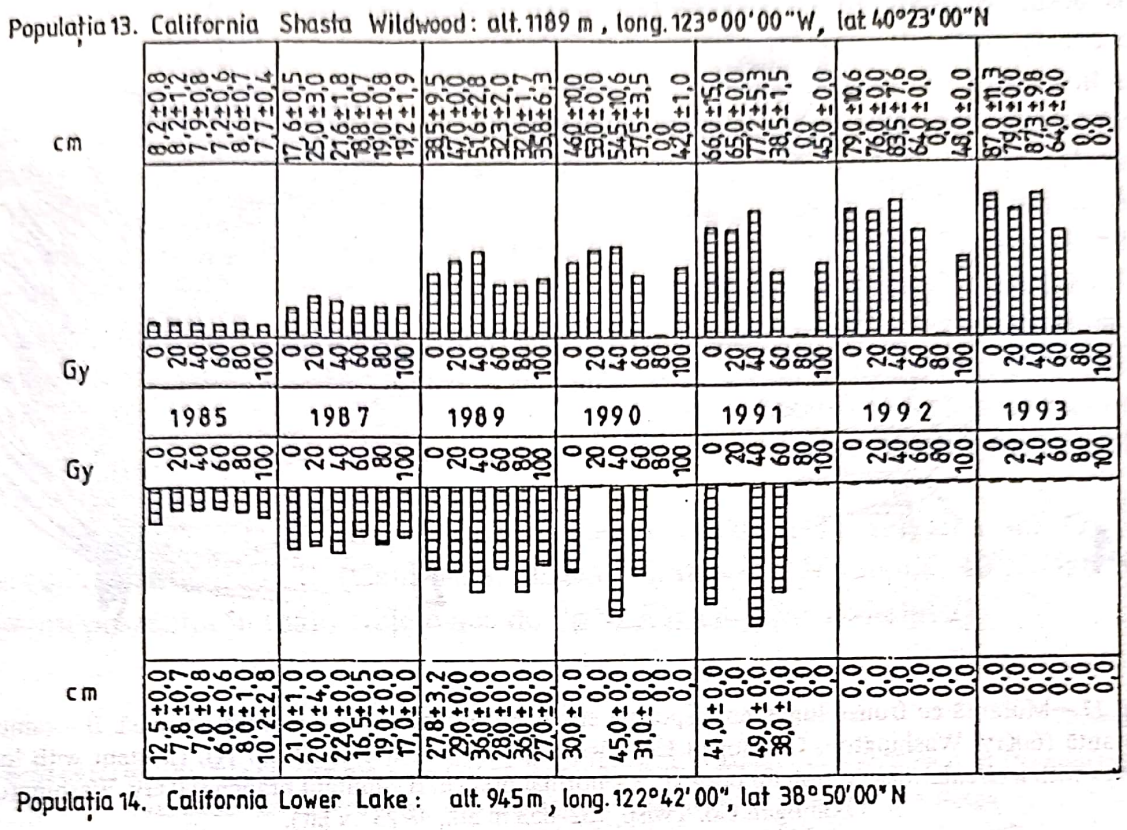


Fig. 10 – Ritmul de creştere al puieţilor de duglas-verde timp de 9 ani (în cm), dependent de doza de radiaţii X (în Gy; populaţiile 13 şi 14) (Seedlings growth rhythm of Douglas-fir during 9 years (in cm) depending on the X – rays dose (in Gy; the 13th and 14th populations)

foarte semnificativă între înălţimea puieţilor), în acest caz avem o mutaţie care afectează ritmul de creştere, nu un fenomen de radiostimulare a creşterii.

b. **Numărul de etaje pe puiet şi distanţa dintre ele** este dependent de genotip, viteza de creştere şi dezvoltarea stadială, fiind influenţat de caracteristicile staţionale ale regiunii de proveniență, competiţia, densitatea plantelor ş.a. Dependent de acestea, s-au depistat puieţi tip laxa şi puieţi tip densa printre plantele din experiment (Privalov, 1967; Corneanu, 1985).

Puieţi tip *laxa* (*macroblaste* sau *dolicoblaste*), cu distanţa mare între noduri, respectiv între etajele de ramuri, caracter care a fost menţionat până la puieţii de 9 ani, au fost depistaţi la unele variante experimentale ale populaţiilor 3 şi 7 (doza 20 Gy) şi la populaţia 8 (doza 100 Gy). Astfel, puieţii de 9 ani de la varianta 20 G, populaţia 3 (Columbia Britanică, Clemina Squamish, 17 m alt., 49°44'40" lat. N), au prezentat înălţimea de 104 cm, având 9 etaje cu o distanţă medie între ele de 11,56 cm, spre deosebire de puieţii cu aspect normal din aceeaşi variantă (90,5 cm înălţime, 12 etaje, 7,45 cm între noduri), sau faţă de puieţii de la martorul neiradiat (106,11 cm înălţime, 11,67 etaje).

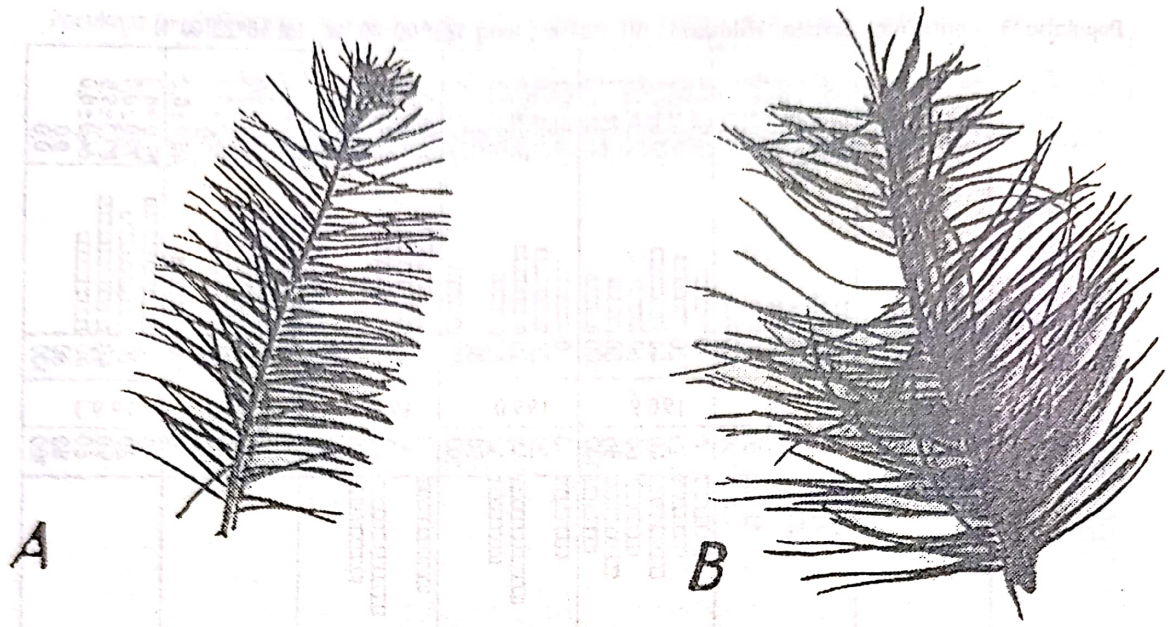


Fig. 11 – Mutantă cu frunze lungi, cu dispoziţie circulară pe ramură: A – ramură normală; B – ramură mutantă (60Gy, Washington, Okanogan Co. Twisp, 732–853 m alt., 48°23′ lat N). (Mutant with long leaves with a circular disposition on branch: A – normal branch; B – mutant branch (60 Gy, Washington, Okanogan Co. Twisp, 732–853 m alt., 48°23′ N lat).

Puieţi tip *densa* (*microblaste* sau *brahiblaste*), cu distanţa mică între noduri, respectiv între etajele de ramuri pe tulpină. Aceştia au prezentat ramuri lungi, bogat ramificate, care le conferă aspect de tufă în stadiile de dezvoltare analizate (1–9 ani). Puieţii de tip *densa* de 9 ani de la varianta 100 Gy, populaţia 8 (Washington, Chellan Co. Chixaucum, 549 m alt., 47°41′ lat. N), au prezentat 87,75 cm înălţime şi 9,75 noduri (etaje), iar puieţii normali de la aceeaşi variantă au prezentat 102,33 cm înălţime şi 9,0 noduri (etaje).

c. **Lungimea acelor şi dispoziţia lor pe ramuri** este dependentă de specie şi influenţată de condiţiile climatice ale anului considerat, proveniența populaţiei, starea fitosanitară, densitate, competiţie, existenţa unor mutante clorofiliene ş.a.

Ace lungi, cu dispoziţie circulară pe ramuri şi vârful de creştere, caracter depistat la o plantă din varianta 60 Gy, populaţia 7 (Washington, Okanogan Co. Twisp, 732–853 m alt., 48°23′ lat. N), care a prezentat acele de 32,2 mm lungime (28,8 mm la martor), având dispoziţie circulară pe ramuri (fig. 11).

d. **Mutante clorofiliene** ale frunzelor, care au afectat întregul puiet provenit din seminţe iradiate, caracterul fiind manifestat pe toată durata experimentului.

Puieţi cu **frunze (ace) tip *chlorina*** au fost întâlniţi la variantele 20 Gy (1 exemplar) şi 40 Gy (1 exemplar), populaţia 3 (Columbia Britanică, Clemina Squamish, 17 m alt., 49°46′40″ lat., N), 80 Gy (1 puiet) populaţia 7 (Washington, Okanogan Co. Twisp, 732–853 m alt., 48°23′ lat. N) şi varianta 100 Gy (3 puieţi), populaţia 8 (Washington, 549 m alt., 47°41′ lat. N). În toate cazurile, puieţii tip

chlorina au prezentat înălţimea mai mică comparativ cu plantele normale din aceeaşi variantă sau cu martorul neiradiat, un număr mai mic de etaje şi ace de lungime mai mică (tabelul 2). În plus, unele plante tip *chlorina* au prezentat un aspect tip *laxa*. Investigaţiile de microscopie optică şi microscopie electronică efectuate asupra structurii şi ultrastructurii frunzelor normale şi de tip *chlorina* (Corneanu ş.a. 1994) au evidenţiat existenţa unor diferenţe semnificative. Au fost înregistrate modificări privind aspectul şi dispoziţia celulelor din hipodermă, ale caracteristicilor canalelor rezinifere, diferenţe în aspectul parenchimului palisadic şi lacunar ş.a., precum şi diferenţe în ultrastructura nucleului şi a cloroplastului (numărul de tilakoide în grana şi dispoziţia lor în cloroplast ş.a.), între frunzele normale şi cele de tip *chlorina*. Toate acestea sprijină caracterul de mutaţie clorofiliană, eliminând totodată posibilitatea existenţei unei infecţii virale, care ar fi fost evidenţiată ultrastructural.

Puieţi cu **frunze (ace)** ***viridis-chlorina***, întâlniţi la varianta 40 Gy (2 exemplare), populaţia 13 (California, Shasta Wildwood, 1189 m alt., 40°23′ lat. N), care au prezentat în toate etajele ace de tip *viridis-chlorina* (tabelul 2).

Tabelul 2

Unele caracteristici biometrice ale puieţilor de 9 ani (normali şi mutante clorofiliene) la *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Some biometrical features of 9 years-old seedlinga (normals and chlorophyllous mutants) in *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*)

Populaţia (Population)	Varianta (Variant) Gy	Înălţime puiet (Seedling height)		Număr noduri (Knots number)		Lungime ace (Needles lenght)	
		$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ cm	sem-nif.	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	sem-nif.	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ mm	sem-nif.
Columbia	20–N	125,0*		11,0*		27,0*	
Clemina Squamish	20–Ch	67.0*		7.0*		19,0*	
Washington	0–N	110,0 ± 11,2		11,6 ± 0,6		24,1 ± 0,9	
Okanogan Co.	20–N	95,0 ± 9,0	–	11,0 ± 1,9	–	22,7 ± 2.0	–
Twisp	40–N	83,8 ± 11,0	–	10,5 ± 0,9	–	25,0 ± 1,2	–
	60–N	71,5 ± 6,5	–	9,5 ± 0,5	–	23,5 ± 0,5	–
	80–N	70,5 ± 7,6	–	8,7 ± 0,9	–	25,3 ± 1,4	–
	80–Ch	63,0 ± 0,0*	00	9,0 ± 0,0*	00	19,0 ± 0,0*	000
Washington	0–N	115,0 ± 8,4		12,3 ± 0,5		23,1 ± 1,8	
Chellan Co.	20–N	95,0 ± 0,0*	–	9,0 ± 0,0*	0	28,0 ± 0,0*	–
Chixaukum	40–N	138,0 ± 17,4	–	12,7 ± 2,4	–	26,0 ± 1,5	–
	60–N	92,8 ± 9,3	–	9,5 ± 0,5	0	26,3 ± 3,1	–
	80–N	98,0 ± 5,1	–	10,3 ± 0,9	0	28,3 ± 0,7	–
	100–Ch	59,0 ± 7,0	00	6,7 ± 0,9	00	19,0 ± 2,0	00
California	0–N	87,0 ± 16,0		9,5 ± 1,5		27,5 ± 0,5	
Shasta Wildwood	40–N	107,8 ± 5,0	–	9,8 ± 0,5	–	27,5 ± 0,5	–
	40–VCh	67,0 ± 17,0	–	9,0 ± 3,0	–	21,5 ± 2,5	–
	80–VCh	60,0 ± 0,0*	–	6,0 ± 0,0*	0	22,0 ± 0,0*	–

* un singur exemplar
N – plantă normală, verde; Ch – plantă chlorina; VCh – plantă viridis-chlorina.

Scanned with OKEN Scanner

CONCLUZII

▼ Cele 14 populaţii de duglas-verde analizate (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*), originare de pe litoralul Pacific al Americii de Nord, au prezentat un răspuns diferit la condiţiile din zona de câmpie cu un climat continental din România (Câmpia de Vest, S.C.S. Pădurea Verde, Timişoara), dependent de condiţiile staţionale ale zonei de proveniență. Cea mai bună creştere şi dezvoltare au prezentat-o populaţiile originare din regiuni cu altitudine înaltă şi latitudine nordică şi/sau originare din regiunile de coastă (populaţiile 8, 7, 9, 5, 13).

▼ Radiosensibilitatea celor 14 populaţii de duglas-verde, stabilită şi analizată pe baza testelor de creştere, a fost diferită. Populaţiile originare din zonele cu altitudine (populaţia 9 din Oregon, Douglas Steam Boat, 1 600 m alt., 43°22′ lat. N), sau din zonele de coastă (populaţia 5 din Columbia Britanică, Caycuse, 213 m alt., 48°55′25″ lat., N), având rezistenţă naturală la unii factori de stres (şocuri termice, curenţi de aer puternici ş.a.), au manifestat o radiorezistenţă ridicată, comparativ cu populaţiile originare din aceeaşi zonă geografică, dar din zonele de interior (populaţia 6 din Columbia Britanică, Sooke, 46 m alt., 48°24′ lat. N), sau din zone cu altitudine şi/sau latitudine scăzută, care au fost radiosensibile.

▼ La populaţiile radiosensibile de duglas-verde, doza de 20 Gy sau 40 Gy radiaţii X aplicată seminţelor uscate, a prezentat un efect radiostimulator asupra ritmului anual de creştere (populaţia 14, California, Lower Lakew, 945 m alt.. 38°50′ lat. N; populaţia 3, Columbia Britanică, Clemina Squamish, 17 m alt., 49°46′40″ lat. N).

▼ Au fost identificate unele mutante (radiomorfoze?) care afectează diferite caractere ale puieţilor: ritm înalt de creştere; distanţa dintre etaje (noduri) pe puiet (puieţi tip *laxa* şi tip *densa*); forme cu ace (frunze) lungi, cu dispoziţie circulară pe ramuri, precum şi mutante clorofiliene ale frunzelor (tip *chlorina* şi tip *viridis-chlorina*) care au afectat întregul puiet.

MUTAGENESIS AND RADIOSENSITIVITY AT DIFFERENT POPULATIONS OF *PSEUDOTSUSA MENZIESII* (MIRB.) FRANCO VAR. *MENZIESII* (DOUGLAS-FIR)

SUMMARY

Fourteen populations of *Pseudotsuga menziessi* (Mirb.) Franco var *menziesii*, native from the Pacific Beach of Northwest America, from different stational regions (Pacific Seacoast or in Rockies Mountains), with altitudes between 17 m – 1 600 m and different North latitude (50° 35′ N lat., British Columbia, Pillar Lake – 38° 35′ N lat, California, Lower Lake), were used in this experiment. The dry seeds belonging to the fourteen population were acute irradiated with X-rays (2 Gy/min dose rate, at doses of, 0, 20, 40, 60, 80 and 100 Gy) and sowed at S.C.S. Pădurea Verde Timişoara (a plain region in Roumania with continetal climate). At the time of 9 years was recorded the seedlings growth rythm, their features and were identified some mutants.

The best aclimatisation to the plain conditions from Romania has been presented by the populations native from the sites with high altitude and/or latitude, as well as the populations native from the Seacoast regions (the 8, 7, 9, 5 and 13 populations).

The radiosensitivity of the fourteen populations of douglas-fir was different. The populations native from the Seacoast regions and/or from the high altitude (with a natural resistance to the other

Scanned with OKEN Scanner

stress factors), manifested a radioresistance, in comparison with the populations originating from the inner regions, or from the regions with low altitude and/or latitude. At these populations, the doses of 20 Gy and 40 Gy presented a radiostimulatory effect on the annual growth rhythm.

Also, were identified some mutants which affected different features: plants with a high growth rhythm; plants of *laxa* or *densa* type; plants with long needles with a circle disposition on branches, as well as the chlorophyllous mutants of *chlorina* and *chlorina-viridis* type.

BIBLIOGRAFIE

Burley, J, 1965 – Karyotype analysis of sitka spruce, *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. Silvae Genet. 14: 127–132.

Corneanu G. C., 1985 – New genotypes of ornamental plants obtained by artificial mutagenesis. Evolution and Adaptation, vol. II, Cluj-Napoca: 221–229.

Corneanu G. C., Blada I., Corneanu M. Mihaela, 1990 – Compared radiosensitivity of some *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii* populations originating from the Pacific Beach of Northwest America. An. şt. Univ. „Al. I. Cuza" Iaşi, s. IIa, Biologie, XXXVI: 137– 142.

Corneanu G., Crăciun C., Crăciun V., 1994 – The leaf mesophyle ultrastructure in *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*. IV European Congres of Cell Biology, Book of Abstracts, Praga, 8 – 12.

El-Lakany M.H., Sziklai O., 1970a – Effects of gamma-irradiation on some western conifers. Radiation Botany, *10* (5): 411–420.

El-Lakany M.H., Sziklai O., 1970b – Variation in nuclear charcteristice in selected western conifers and its relation to radiosensitivity. Radiation Botany, *10* (5): 421–427.

Enescu V., 1975 – Ameliorarea principalelor specii forestiere – partea specială. Edit. Ceres, Bucureşti, 314 pp.

Haralamb A. M., 1956 – Cultura speciilor forestiere. Edit. Agro-Silvică de Stat, Bucureşti, 510 pp.

Kuiper L. C., 1988 – The structure of natural Douglas-fir forests in Western Washington and Western Oregon. Agric. Univ. Wageningen Papers 88–5, 47 pp.

Ohba K., Simak M., 1961 – Effect of X-rays on seeds of scots pine from different-provenances (*Pinus strobus* L.). Silvae Genet. *10*: 24–90.

Privalov C.F., 1967 – Experimental mutations in woody plants. In: Induzierte Mutationen and Ihre Nutzung (Hrsg. H. Stubbe), pp. 383–386, Akademie-Vlg., Berlin.

Schober R., Meyer H., 1955 – Douglasien – Provenienzversuche II. Allg. Forest. u. Jagdzg., 126: 221–243.

Tralau H. V., 1957 – Beitrag zur Kenntnis der Variabilität der Kichte. II. Die Wirkung von Gamma-Strahlung auf *Picea abies*. Botan. Notiser, 110: 442–459.

Wright J. W., 1965 – Aspecte genetice ale ameliorării arborilor forestieri. FAO – Studii asupra pădurilor şi produselor forestiere. Nr. 16, Bucureşti, 371 pp.

Scanned with OKEN Scanner

TRANSLOCAȚIA ÎN TANDEM LA VITELE DE RASĂ BĂLȚATĂ CU NEGRU ROMÂNEASCĂ

BRÂNDUȘA ELENA LIVESCU, IOANA NICOLAE*

Heterozigoția pentru un rearanjament cromozomal este cauza probabilă a fertilității reduse a purtătorilor, uneori chiar a sterilității. Rearanjamentele cromozomale sunt anomalii structurale care rezultă în urma unor rupturi, urmate de reunirea capetelor rupte într-un mod nou, însoțite sau nu de pierdere de material genetic.

Translocațiile sunt rearanjamente cromozomale, fără pierdere de material genetic, care presupun transferul unui segment cromozomal din poziția sa normală într-o poziție diferită pe un alt cromozon nehomolog putând îmbrăca diferite forme: translocația reciprocă (RT) (Gustavsson și colab., 1968; Paravathi și colab., 1988), translocația robertsoniană (Rob T) și translocația în tandem (Tan T). Translocația în tandem, extrem de rar descrisă la taurine (Hansen, 1969; Moraes, 1978; Chowdhary et al., 1989) se produce ca urmare a două rupturi: proximal pe brațul lung al unui cromozom și distal pe brațul lung al unui alt cromozom, urmate de fuziunea capetelor rupte, astfel încât rezultă două elemente cromozomale noi, fără pereche și anume un element excepțional de mare și unul excepțional de mic (fig. 1).

În lucrarea prezentă ne-am propus să cercetăm originea translocației în tandem, identificată întâmplător în rasa Bălțată cu negru românească, modul ei de ereditare, ca și posibilele tulburări în exprimarea normală a capacității reproductive la purtătorii heterozigoți.

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

Materialul nostru a fost reprezentat inițial de Probandul 1 cu Tan T. (vaca 84–130) și ulterior de Probandul 2 cu Tan T. (taurul cod 18139 Mapple 13 matr. 880 433), semifrate matern al lui P–1. Lui P–1 și P–2 li s-a adăugat Probandul 3 (una din cele două fiice rezultate din P–1). Din materialul cercetat au făcut parte rude colaterale sau descendente, identificate prin ancheta genealogică.

* Institutul de Cercetare pentru Creșterea Bovinelor, Balotești

Scanned with OKEN Scanner

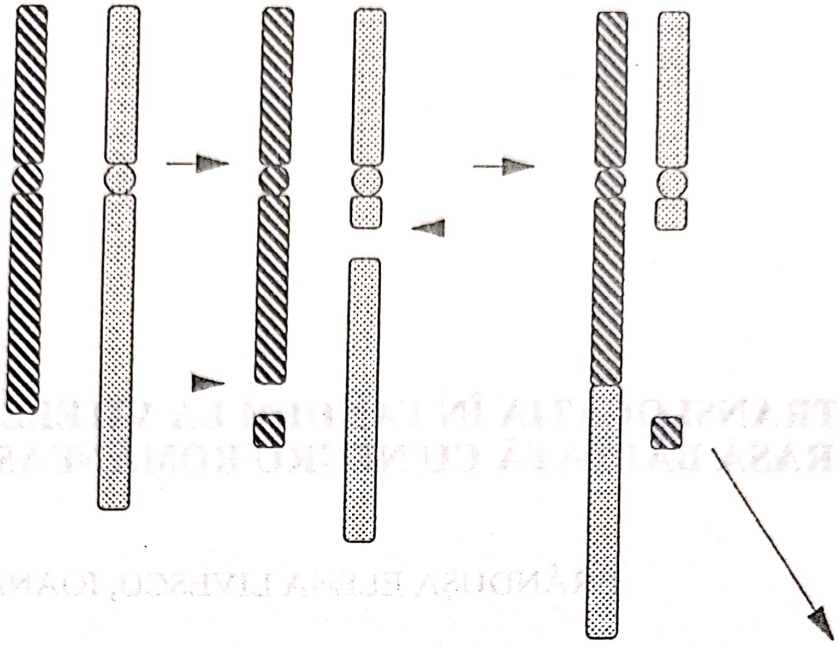


Fig. 1 – Formarea translocaţiei în tandem, prin rupere şi reunire, în doi cromozomi acrocentrici. (Formation of a Tandem translocation by chromosome breakage and reunion in two acrocentric chromosomes).

Probandul 1 cu Tan T a fost identificat întâmplător cu ocazia unei anchete genetice pentru elucidarea etiologiei unor cazuri de arthrogripoză congenitală. Coincidental, în cadrul unei analize rutinale de cariotip a putut fi identificat Probandul 2, care s-a dovedit purtător de Tan T şi semifrate matern al lui P–1. Au mai fost identificate următoarele rude ale probanzilor P–1 şi P–2:

- 2 semisurori materne cu P–1 şi P–2 şi 2 nepoţi de semisurori;
- 12 semifraţi paterni ai lui P–1;
- 5 semifraţi paterni ai lui P–2;
- 2 fiice ale Probandului 1 şi 2 nepoate de fiică;
- 6 descendenţi din P–2.

Dacă P–1 şi P–2 au avut aceeaşi mamă şi anume vaca 800306, P–1 a avut drept tată pe Bootmaker 9053, iar P–2 pe Maple 50620. Nici vaca 800306 nici cei doi tauri nu au putut fi investigaţi citogenetic, nemaifiind în viaţă.

Tuturor rudelor identificate prin anchetă familială li s-a efectuat examenul citogenetic în vederea stabilirii incidenţei anomaliei în cadrul familiei şi a modului de ereditare. Examenul citogenetic s-a repetat la diferite intervale la purtătorii heterozigoţi de Tan T, pentru a conchide asupra stabilităţii constituţiei cromozomale anormale.

Preparatele metafazice s-au obţinut prin tehnica de microcultură din sânge integral, utilizând MEM (minimal essential medium) ser neonatal de viţel (15%), soluţie de aminoacizi N–16 (2,5%), adaos de antibiotice (penicilină + streptomicină) şi fitohemaglutinină M (0,1 ml/7 ml amestec) ca stimulent mitotic pentru un inoculum celular reprezentat de sânge integral (Livescu şi

Scanned with OKEN Scanner

Samarineanu, 1972). La sfârşitul incubaţiei de 72 de ore la 38°C, s-a efectuat recoltarea şi prelucrarea culturilor prin colchicinizare, hipotonizare, 3–4 fixări. Preparatele s-au efectuat prin procedeul uscării la aer, iar colorarea lor s-a făcut convenţional Giemsa. După caz, preparatele metafazice s-au supus tratamentului pentru evidenţierea heterocromatinei constitutive (benzi C), după o variantă a tehnicii lui Sumner (1972).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Cei doi probanzi cu Tan T, descoperiţi coincidental la interval de cca un an, având aceeaşi mamă au impus de la bun început presupunerea originii materne a anomaliei, fără ca aceasta să poată fi întărită prin examenul citogenetic al mamei, aceasta nemaifiind în viaţă.

La primul examen, probanzii au prezentat în toate celulele examinate 60 de elemente cromozomale, numărul euploid al speciei de altfel, dar cu o configuraţie deosebită în sensul prezenţei unui element cromozomal acrocentric deosebit de lung, nepereche şi a unui element acrocentric excepţional de scurt, de asemenea nepereche. Această configuraţie corespunde descrierii translocaţiei în tandem care a afectat doi cromozomi neomologi (fig. 2, fig. 3). Realitatea fuziunii în tandem a capetelor adezive în punctele de ruptură a putut fi evidenţiată prin bandare C, care a colorat distinct pe cele două cromatide ale neocromozomului uriaş de tip acrocentric două puncte de heterocromatină constitutivă, provenind desigur din zona pericentromerică a partenerului cromozomal care a suferit o ruptură proximal, deci în imediata apropiere a centromerului. Centromerul rămas în urma acestei rupturi nu s-a pierdut, ci s-a conservat ca un minuscul element centric (fig. 4), deşi Hansen (1969), când defineşte translocaţia în tandem, afirmă pierderea acestuia.

Ancheta genealogică şi examenul citogenetic ne-au permis să stabilim incidenţa familială a anomaliei, implicit modul de ereditare (fig. 5). Dacă pentru translocaţia robertsoniană 1/29, anomalie larg răspândită în populaţiile de taurine de diferite rase şi în diverse areale geografice, se recunoaşte un mod de ereditare mendelian simplu, prin care jumătate din descendenţi, masculi şi femele, vor moşteni anomalia, pentru translocaţia în tandem se presupune un mod similar de ereditare, succintele informaţii din literatură nefiind relevante însă.

Analizând informaţiile noastre rezultate din ancheta familială şi examenul citogenetic al tuturor membrilor familiei care au putut fi identificaţi s-au constatat următoarele:

Din părintele comun al probanzilor P–1 şi P–2, şi anume vaca 800306, au mai fost identificaţi doi descendenţi de sex femel care au avut cariotip normal, deci raportul PROBAND: NORMAL a fost de 2 : 2, raportul mendelian aşteptat (1 : 1).

Din cele două fiice ale probandului P–1 (vaca 84–130), una (87–46) a prezentat Tan T (P–3), cea de a doua (88–132) a avut cariotip normal, deci acelaşi raport mendelian aşteptat. Informaţiile noastre, chiar dacă nu sunt foarte numeroase, susţin pentru translocaţia în tandem o ereditare de tip mendelian simplu, ca şi în cazul translocaţiei robertsoniene.

Scanned with OKEN Scanner

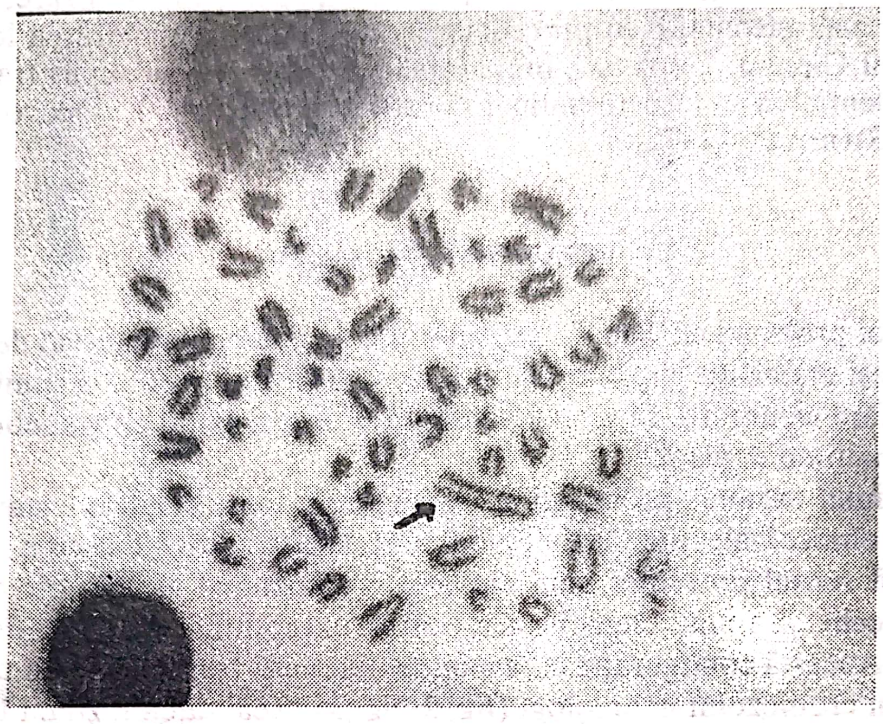


Fig. 2 – Metafază 2n = 60, XX, Tan T (A metaphase 2n = 60, XX, Tan T)

Deşi tatăl probandului P–1 nu a fost investigat citogenetic, examenul de cariotip efectuat unui număr de 12 fii ai acestuia, aflaţi la I.A., semifraţi paterni cu P–1, a relevat în toate cazurile o constituţie cromozomală normală. Aceasta îndreptăţeşte concluzia că anomalia identificată la P–1 este de origine maternă, concluzie susţinută şi de rezultatul investigării citogenetice a cinci semifraţi paterni ai lui P–2, care au avut de asemenea cariotip normal.

Repetarea examenului citogenetic la cei trei probanzi P–1, P–2 şi P–3, la diferite intervale de timp, a relevat stabilitatea anomaliei la purtătorii de sex femel, P–1 şi fiica acesteia P–3 şi în mod cu totul surprinzător şi dificil de explicat instabilitatea ei la purtătorul mascul P–2. Astfel, dacă la primul examen citogenetic, translocaţia în tandem a fost prezentă în 100% din celulele examinate la toţi cei trei probanzi, la examinările ulterioare configuraţia cromozomală anormală a continuat a exista în toate celulele examinate de la P–1 şi P–3, în timp ce la P–2, de sex mascul, s-a constatat o descreştere a numărului de celule purtătoare de translocaţie, concomitent cu apariţia şi creşterea numerică a celulelor cu configuraţie cromozomală normală, pentru ca la ultimul examen citogenetic efectuat lui P–2 să se constate numai celule cu complement cromozomal normal. Această dinamică spre normalizarea cariotipului explică de altfel şi absenţa anomaliei la toţi cei 6 descendenţi ai lui P–2 care au fost examinaţi citogenetic (tabelul 1). Absenţa anomaliei la descendenţii lui P–2 conduce la presupunerea că celulele formatoare de gameţi nu au fost purtătoare de anomalie, ceea ce pune sub semnul întrebării identitatea anomaliei Tan T de la probanzii de sex-femel P–1 şi P–3 cu aceea identificată la probandul mascul P–2.

Scanned with OKEN Scanner

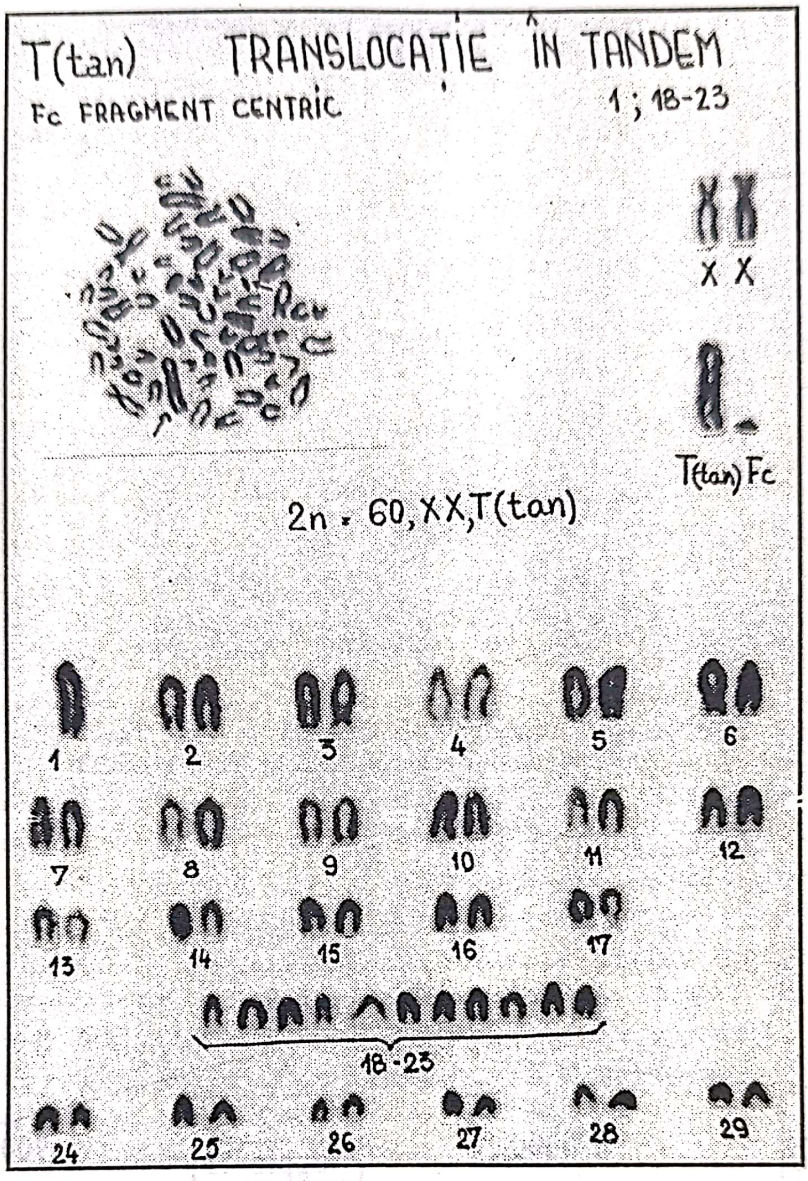


Fig. 3 – Cariotipul unei celule 2n = 60, XX, Tan T (Karyotype of a cell 2n = 60, XX, Tan T)

Referitor la implicaţiile prezenţei Tan T asupra capacităţii reproductive a purtătorilor heterozigoţi, teoretic, ele sunt aceleaşi ca şi în cazul altor rearanjamente cromozomale balansate, şi anume, perturbări meiotice, consecutiv nondisjuncţiei cromozomale şi apariţia de gameţi neechilibraţi, alături de gameţi normali, echilibraţi (Gustavsson, 1979, 1980.

Participarea la fecundare a unor astfel de gameţi neechilibraţi genetic va conduce la formarea unor zigoţi anormali, moarte timpurie şi rezorbţie embrionară, urmată de revenirea în călduri a subiectului. Astfel de subiecţi au deci o fertilitate diminuată, comparativ cu contemporanii cu cariotipul normal.

Scanned with OKEN Scanner

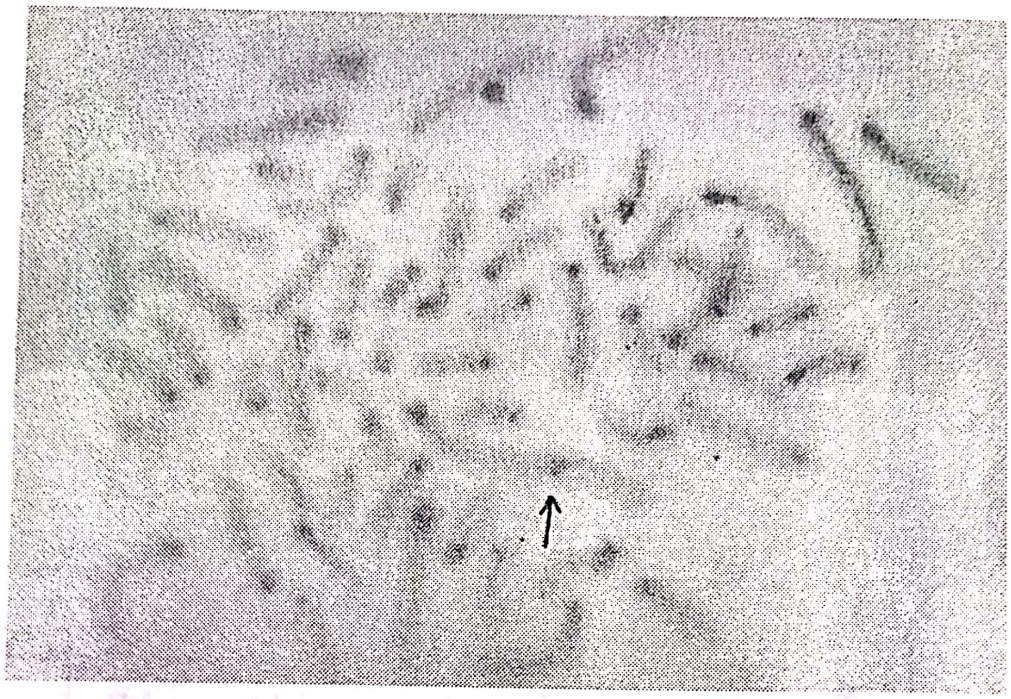
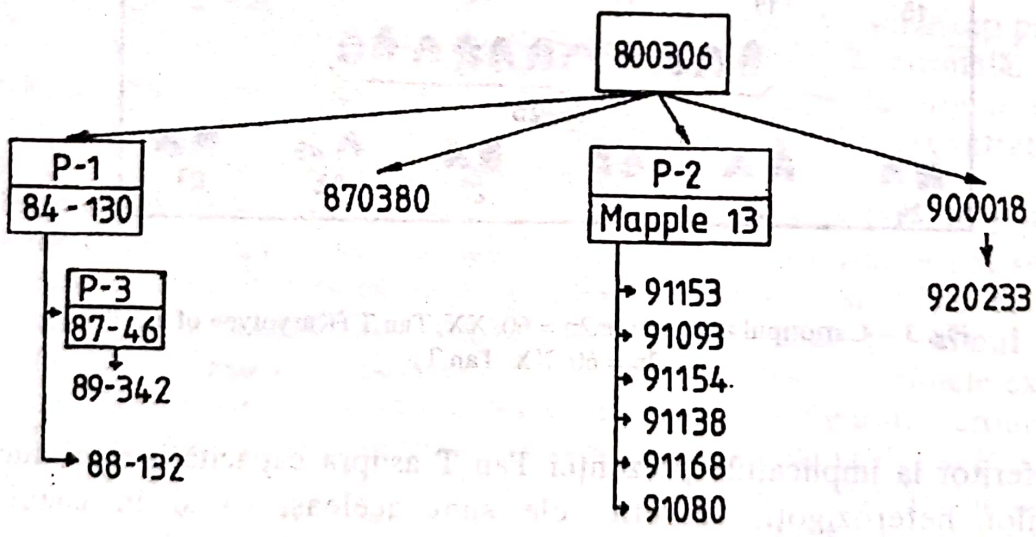


Fig. 4 – Cromozomi C bandați într-o metafază 2n = 60, Tan T (C – banded chromosomes in a metaphase 2n = 60, Tan T)



Notă: Figura nu cuprinde pe cei 12 semifrați paterni ai lui P-1 (T:9053) și pe cei 5 semifrați paterni ai lui P-2 (T:50620), originea maternă a Tan T fiind dovedită.

Fig. 5 – Incidența familială a translocației în tandem (Family incidence of the Tandem translocation)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Examenul citogenetic al purtătorilor de Tan T
(Cytogenetic examination of the Tan T carriers)

Data examinării (Date of the examination)	Probandul P–1		Probandul P–2		Probandul P–3	
	Număr de celule examinate (Number of examined cells)	% celule cu Tan T (% Tan T cells)	Număr de celule examinate (Number of examined cells)	% celule cu Tan T (%Tan T cells)	Număr de celule examinate (Number of examined cells)	% celule cu Tan T (% Tan T cells)
08.06.1988	50	100	–	–	–	–
15.07.1988	45	100	–	–	–	–
14.11.1988	50	100	–	–	–	–
07.04.1989	30	100	–	–	–	–
01.11.1989	50	100	–	–	50	100
12.02.1990	25	100	–	–	35	100
11.05.1990	–	–	40	100	40	100
16.08.1990	–	–	28	100	–	–
07.05.1991	–	–	46	60,8	–	–
03.06.1991	–	–	50	18	–	–
12.07.1991	–	–	60	0	–	–
19.08.1991	–	–	48	0	–	–

Atât probandul P–1, cât şi fiica ei cu Tan T, probandul P–3, au avut o viaţă reproductivă scurtă. Astfel, probandul P–1, după două fătări, a fost reformată ca urmare a unor monte repetate, neurmate de gestaţie, cu diagnostic de endometrită şi corp galben persistent. Fiica ei cu Tan T, P–3, după o fătare normală, a fost de asemenea însămânţată în mod repetat, fără a se realiza vreo gestaţie. Şi în cazul probandului mascul P–2, deşi anomalia a fost prezentată numai temporar şi, presupunem noi, numai la nivelul celulelor albe din sângele circulant, nu s-a remarcat o longevitate normală în activitatea de reproducţie, el fiind îndepărtat de la însămânţări artificiale înainte de terminarea testelor care să-l confirme ca taur reproducător.

CONCLUZII

▼ Translocaţia în tandem, identificată la o vacă de rasă BNR (proband P–1), la un taur IA – semifrate matern cu P–1 – (proband P–2) şi la una din cele două fiice ale probandului P–1 (proband P–3) se eredităză mendelian simplu.

▼ Anomalia nu a apărut „de novo", ci ea pare a fi fost moştenită de la mama probanzilor P–1 şi P–2, originea paternă a anomaliei fiind exclusă în urma examenului citogenetic efectuat în familiile paterne.

▼ Câteva examinări citogenetice succesive au relevat constanţa anomaliei Tan T în cazul probanzilor P–1 şi P–3, în toate celulele examinate.

▼ Tulburările în activitatea reproductivă a purtătorilor heterozigoţi de Tan T, manifestate mai ales prin monte repetate şi fertilitate diminuată confirmă perturbările meiotice presupuse a însoţi acest rearanjament cromozomal.

Scanned with OKEN Scanner

TANDEM TRANSLOCATION IN ROMANIAN BLACK SPOTTED BREED OF CATTLE

SUMMARY

A Romanian Black Spotted cow carrying a very rare chromosomal rearrangement as „tandem translocation" was by chance identified and this fact made possible the initiation of a research on the origin and the genetic transmission of this chromosomal abnormality.

Using family and cytogenetic analysis one could establish the maternal origin and the mendelian way in hereditary transmission of this abnormality as in other structural rearrangements.

Heterozygote carriers of this abnormality were eliminated due to some reproductive troubles. This confirms the expected relationships between this chromosomal aberration and the phenotypic effect on the reproductive efficiency.

It is also important to mention our observations on the instability of this chromosomal aberration in a male carrier. This was revealed after some succesive cytogenetic examinations. One noticed a decrease of abnormal cell line 2n = 60, XY, Tan T from 100 % to 15 % and finally to 0 %. The abnormal cell line have been replaced with the normal cell line 2n = 60, XY.

BIBLIOGRAFIE

Chowdhary B. P. Gustavsson I., Kunavongkrit A., Lohachit C., Makinen A., 1989 – Detailed mitotic description on the tandem fusion translocation differentiating river and swamp bufflo. Buffalo J., 1: 41–49.

Gustavsson I., 1979 – Distribution and effects of the 1/29 robertsonian translocation in cattle. J. Dairy Sci., 62 (5): 825–835.

Gustavsson I., 1980 – Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals. Z. Tierz. Zűchtungsbiol, 97: 176–195.

Gustavsson I., Fraccaro M., Tiepolo L., Lindsten J., 1968 – Presumptive X-autosome translocation in a cow: preferential inactivation of the normal X chromosome. Nature, Lond. 218: 183–184.

Hansen K. M., 1969 – Bovine tandem fusion and fertility. Hereditas 63.: 453–454.

Livescu B. E., Samarineanu M., 1972 – Contribuţii la îmbunătăţirea tehnicii de microcultură din sânge integral pentru studiul cromozomilor la speciile taurine şi ovine. Sesiune ştiinţifică Institutului de Cercetare pentru Creşterea Taurinelor.

Mayr B., Themsessel H., Wockl F., Schleger W., 1979 – Reziproke Translokation 60, XYt (10; 11) (41; 14) beim Rind. Tierzucht (in press) (citat de Gustavsson în: Z. Tierz. Zuchtungsbiol., 97: 176–195).

Moraes J. C. F., 1978 – Estudos cromossomicus em diferentes racas do rebanho bovino do Rio Grande do Sul-Thesis- citat de Gustavsson în: Z. Tierz. Zuchtungsbiol., 97: 176–195.

Paravathi R., Basrur P. K., Popescu C. P., Pinheiro Luiz E. L., Berepubo N. A., Reys E. R., 1988 – Non random pattern of X-autosome translocation carrier cows. Abstracts XVI th Int. Congr. Genet., 20–27 aug. 1988, Toronto Canada.

Sumner A. T., 1972 – A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75: 304–306.

Scanned with OKEN Scanner

TANDEM TRANSLOCATION IN ROMANIAN BLACK SPOTTED BREED OF CATTLE

SUMMARY

A Romanian Black Spotted cow carrying a very rare chromosomal rearrangement as „tandem translocation" was by chance identified and this fact made possible the initiation of a research on the origin and the genetic transmission of this chromosomal abnormality.

Using family and cytogenetic analysis one could establish the maternal origin and the mendelian way in hereditary transmission of this abnormality as in other structural rearrangements.

Heterozygote carriers of this abnormality were eliminated due to some reproductive troubles. This confirms the expected relationships between this chromosomal aberration and the phenotypic effect on the reproductive efficiency.

It is also important to mention our observations on the instability of this chromosomal aberration in a male carrier. This was revealed after some succesive cytogenetic examinations. One noticed a decrease of abnormal cell line 2n = 60, XY, Tan T from 100 % to 15 % and finally to 0 %. The abnormal cell line have been replaced with the normal cell line 2n = 60, XY.

BIBLIOGRAFIE

Chowdhary B. P. Gustavsson I., Kunavongkrit A., Lohachit C., Makinen A., 1989 – Detailed mitotic description on the tandem fusion translocation differentiating river and swamp bufflo. Buffalo J., 1: 41–49.

Gustavsson I., 1979 – Distribution and effects of the 1/29 robertsonian translocation in cattle. J. Dairy Sci., 62 (5): 825–835.

Gustavsson I., 1980 – Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals. Z. Tierz. Zűchtungsbiol, 97: 176–195.

Gustavsson I., Fraccaro M., Tiepolo L., Lindsten J., 1968 – Presumptive X-autosome translocation in a cow: preferential inactivation of the normal X chromosome. Nature, Lond. 218: 183–184.

Hansen K. M., 1969 – Bovine tandem fusion and fertility. Hereditas 63.: 453–454.

Livescu B. E., Samarineanu M., 1972 – Contribuții la îmbunătățirea tehnicii de microcultură din sânge integral pentru studiul cromozomilor la speciile taurine și ovine. Sesiune științifică Institutului de Cercetare pentru Creșterea Taurinelor.

Mayr B., Themsessel H., Wockl F., Schleger W., 1979 – Reziproke Translokation 60, XYt (10; 11) (41; 14) beim Rind. Tierzucht (in press) (citat de Gustavsson în: Z. Tierz. Zuchtungsbiol., 97: 176–195).

Moraes J. C. F., 1978 – Estudos cromossomicus em diferentes racas do rebanho bovino do Rio Grande do Sul-Thesis- citat de Gustavsson în: Z. Tierz. Zuchtungsbiol., 97: 176–195.

Paravathi R., Basrur P. K., Popescu C. P., Pinheiro Luiz E. L., Berepubo N. A., Reys E. R., 1988 – Non random pattern of X-autosome translocation carrier cows. Abstracts XVI th Int. Congr. Genet., 20–27 aug. 1988, Toronto Canada.

Sumner A. T., 1972 – A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75: 304–306.

Scanned with OKEN Scanner

IDENTIFICAREA TIPURILOR ŞI FRECVENŢEI VARIAŢIILOR EUPLOIDE ŞI ANEUPLOIDE LA PUII MUTANŢI TRANSGENICI „RUMPLESS COMPLET"

VIRGINIA MATEESCU, ILEANA MICU *

În ciuda imensei naturi complexe ale păsărilor şi mamiferelor, sub aspect fiziologic şi genetic, rezultă prin reproducţie generaţii care sunt normale în general, cu seturile de cromozomi şi gene ce caracterizează precis fiecare specie.

Totuşi, pot apărea şi deviaţii de la normal, reprezentate de numărul, morfologia şi structura cromozomilor mitotici, situaţii ce pot fi diagnosticate cu mare precizie, citogenetic.

Mutaţiile ereditare de tip „rumpless complet" (lipsa a 6 vertebre caudale) şi „rumpless intermediar" (lipsa a 3–4 vertebre caudale), obţinute prin transformare genetică la I.C.P.P.A.M. Baloteşti (Mateescu, Mocanu, Mitran, 1984), asemănătoare cu cele existente spontan, în populaţiile de *Gallus domesticus*, dar cu o frecvenţă redusă, sub 0,1 % au fost şi sunt studiate din punct de vedere al aberaţiilor cromozomale de tip numeric şi structural, numai în ţara noastră.

Prima semnalare de anomalii cromozomale numerice, de tipul trisomie şi haploidie, la descendenţii transgenici Leghorn F_2 şi F_3 proveniţi din femele carunculate, încrucişate cu masculi normali fenotipic, sau masculi mutanţi „rumpless complet", nu a condus la concluzia existenţei unor modificări semnificative de structură terţiară a macrocromozomilor marcaţi chimic *in vivo*, pentru evidenţierea SCE. Astfel, s-a demonstrat că prin trasferul dirijat de material genetic heterolog, în sistem intrafolicular ovarian, conform procedeului aplicat, frecvenţa SCE (schimburile între cromatidele surori) a fost în limitele 1,87 %–3,33 %, la puii normali fenotipic, rezultaţi din 5 variante de încrucişare (♀ necarunculare x ♂ necarunculaţi; ♀ rumpless x ♂ rumpless; ♀ carunculate x ♂ rumpless; ♀ carunculate x ♂ necarunculaţi; ♀ carunculate x ♂ carunculaţi (Mateescu, 1989).

* Institutul de Cercetare şi Producţie pentru Păsări şi Animale Mici, Baloteşti

Scanned with OKEN Scanner

Continuând studiile citogenetice, au fost analizate primele şapte perechi de macrocromozomi, din 145 metafaze, provenite din măduva femurală a puilor mutanţi „rumpless complet" F_4, la care nu s-au semnalat aberaţii cromozomale de tip numeric şi structural, frecvenţa SCE fiind de 0,952 % (Mateescu, 1989).

Ulterior, la generaţia de pui mutanţi „rumpless complet" F_{11}, s-au stabilit în celulele măduvei osului femural, trei tipuri de mozaicism: A–W/2A–ZW; A–Z/2A–ZZ; AW, 3+/A–Z/2A–ZW/2A–ZZ, puii diploizi „rumpless complet" conţinând în populaţiile celulare o frecvenţă de 3,12 %–11,11 % celule haploide. La aceeaşi generaţie F_{11} de pui mutanţi „rumpless complet", s-au constatat SCE, la macrocromozomii perechilor 1, 2 şi 4 cu o frecvenţă în limitele 7,69 %–13,64 %, iar ca aberaţie cromozomală structurală s-au identificat translocaţii de tipul 4q-, 3q- şi 1q-, 3q+ (Mateescu şi Micu, 1994 b).

Dintr-un studiu citogenetic, pe un total de 427 metafaze mitotice, provenite de la populaţiile celulare ale măduvei femurale, aparţinând unui lot de 8 pui „rumpless complet", din generaţia F_{12}, reiese faptul că acestea sunt mixoploide. Mozaicul cromozomal este dovedit de existenţa unei variaţii euploide (A–W/2A–ZW; A–Z/2A–ZZ) şi aneuploide (2A–ZZ,4+; 2A–ZW,1–,3+), pe care le putem afirma ca una din trăsăturile citologice de bază, constatate la puii mutanţi „rumpless complet". Frecvenţa variaţiilor euploide (haploidii) poate varia în limitele 3,44 %–42,42 %, iar cea a variaţiilor aneuploide (de tipul monosomii, trisomii) există în limitele 2.04 %–31,03 %, la puii mutanţi transgenici Leghorn „rumpless complet" (Mateescu şi Micu, 1994 a, b).

Pe de altă parte, prin aplicarea testului de mutageneză, privind localizarea NOR (regiunea organizator nucleolară), în plăcile metafazice ale puilor mutanţi transgenici „rumpless", nu s-au identificat şi alte zone de organizare nucleolară pe macrocromozomi, acestea fiind numai pe microcromozomii perechilor 16–18, identic ca la metafazele puilor normali fenotipic, concluziile din acest punct de vedere fiind asemănătoare cu cele ale lui Bloom şi Cole, 1978; Mateescu, 1992).

Întrucât genotipurile mutante „rumpless complet" pot reprezenta nuclee de material biologic în scopul reperării regiunilor cromozomale, în care sunt situate genele responsabile pentru maladiile ereditare ale scheletului, prin mesajele incorecte date încă din fazele timpurii ale embriogenezei, am considerat necesară examinarea la microscopul optic a tipurilor de tulburări ale genomului aviar şi în generaţia F_{13}, pentru mutaţia menţionată.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

S-au reprodus 84 cupluri, din lotul de păsări transgenice Leghorn, rezultând 862 pui descendenţi F_{13}, din care 802 pui (93 %) au avut fenotip normal, iar 60 pui (7%) au constituit lotul de pui „rumpless intermediar" şi „rumpless complet".

Scanned with OKEN Scanner

Au fost vizualizate 413 metafaze din măduva osoasă tibială şi femurală, provenită de la 13 pui mutanţi transgenici Leghorn „rumpless complet" F_{13}, din care patru au fost cocoşei şi 9 puicuţe, în vârstă de două zile.

Cromozomii, marcaţi cu 5-Brom-2'-deoxiuridină (FLUKA AG), pentru evidenţierea schimburilor între cromatidele surori (SCE), au fost coloraţi cu Giemsa Merck (parţial metoda Miltenburger, citat de Raicu, 1983).

Microfotografiile cele mai reprezentative s-au realizat la microscopul optic Leitz Dialux 22, cuplat la Wild Photoautomat MPS 45, folosind filme negative AZOPAN PS 24 şi timpi de expunere în imersie, de 15 secunde.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La patru cocoşei mutanţi transgenici Leghorn „rumpless complet", descendenţii F_{13}, din genitori F_{12} cu fenotip normal, s-au constatat frecvenţe ale celulelor haploide, în limitele 11,1 %–30,6 % şi a SCE între 3,7 %–11,1 %.

Din nouă puicuţe F_{13} mutante „rumpless complet", opt puicuţe au provenit din părinţi cu fenotip normal, iar una a rezultat din combinaţia ♀ fenotip normal x ♂ rumpless complet, limitele frecvenţei haploidiei fiind între 4 %–48 %, iar a SCE între 1,9 %– 26,2 %.

Deci, atât din punct de vedere al frecvenţei haploidiei cât şi a SCE, există o variabilitate mare de la un individ la altul, care se menţine şi în F_{13}.

De remarcat este faptul că haploidia s-a constatat şi la puii „rumpless" din generaţiile F_{11}–F_{12}, frecvenţa medie fiind de 6,45 % (F_{11}) şi 10,49 % (F_{12}), la cocoşei şi de 7,87 % (F_{11}), 16,90 (F_{12}), la puicuţe, comparativ cu 18,15 % (F_{13}) la cocoşei şi 22,60 % (F_{13}) la puicuţe. Uneori, în aceleaşi condiţii de colchicinizare, datorită unei frecvenţe crescute a haploidiei, preparatele citogenetice, vizualizate la microscopul optic, dau impresia la prima examinare că provin de la pui cu indice mitotic redus, prin scăderea numărului de metafaze diploide (fig. 1, fig. 2).

În afară de variaţiile euploide de tipul haploidiei, în care este modificat complementul cromozomal somatic, cu frecvenţe diferite, în cadrul liniilor celulare aberante multiple, la puicuţe „rum pless complet", s-au identificat şi următoarele variaţii aneuploide:

- trisomia 4, asociată cu deleţia braţelor lungi (q) la unul din cromozomii grupei 4;
- trisomia 4 şi monosomia 3;
- trisomia 4 asociată cu translocaţia 2q-, 3q+;
- numai trisomia 4;
- monosomia 4.

Trisomiile 3 şi 4 au fost identificate şi în populaţiile celulare mixoploide, din măduva osoasă femurală şi tibială a puilor „rumpless complet" din F_{12} (Mateescu şi Micu, 1994 b).

Scanned with OKEN Scanner

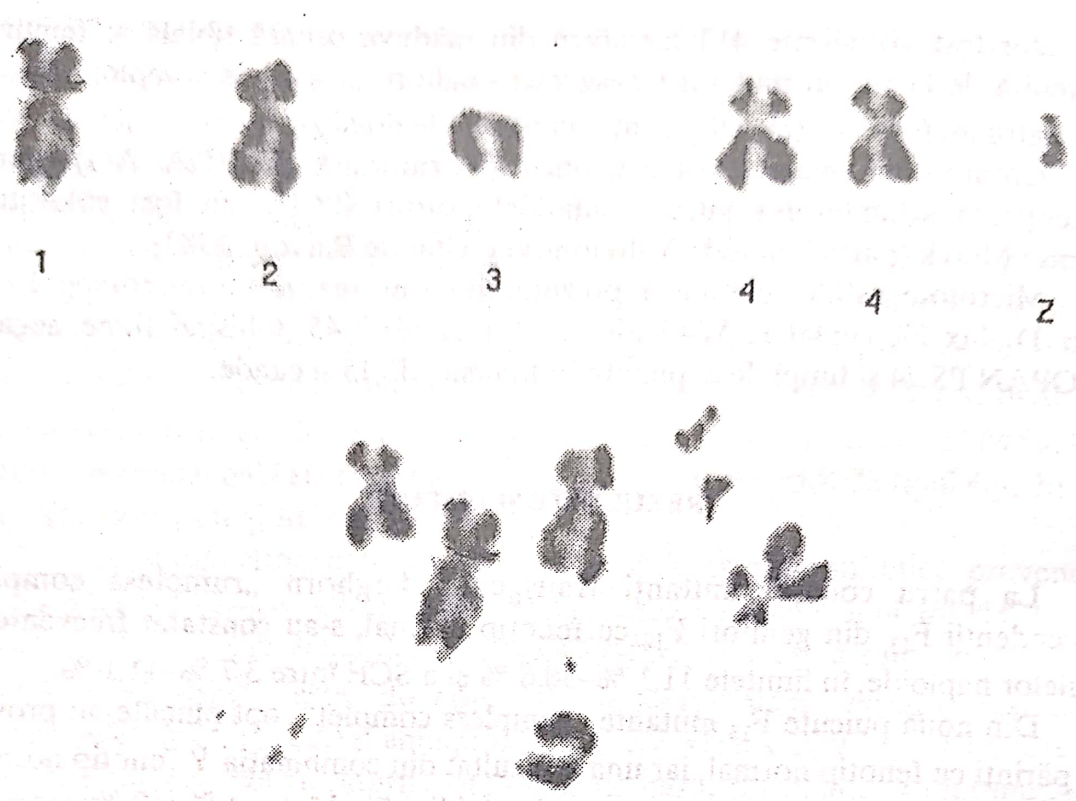


Fig. 1 – Cariotip parţial al unei metafaze mitotice haploide cu disomie 4, din măduva femurală, la pui transgenic Leghorn, mutant „rumpless complet", în vârstă de 2 zile (A–Z,4+) (Partial karyotype of haploid mitotic metaphases with 4-disomy of femural marrow in „completely rumpless" Leghorn mutant transgenic chicks on the second day of life (A-Z,4+)

În F_{13}, trisomia 3 a fost în limitele de variaţie 2,6 %–3,7 %, la cocoşei şi 2,4 %–14,8 % la populaţiile celulare din măduva femurală şi tibială a puicuţelor, iar trisomia 4 a fost reprezentată cu o frecvenţă de 7,4 %–25 %, la cocoşei şi 2,4 %–14,29 % la puicuţe (tabelul 1).

Urmarea analizei polimorfismului modificărilor cromozomale numerice (haploidii, trisomii, monosomii) şi structurale (deleţii, translocaţii), constatate la celulele somatice ale puilor „rumpless complet", putem conchide că această mutaţie poate fi încadrată în grupa macromutaţiilor cu efecte neletale pentru pui şi păsări adulte, reproduse atât prin împerecherea la sol cât şi prin însămânţări artificiale.

Tabelul 1

Situaţia frecvenţei modificărilor numerice cromozomiale la puii mutanţi transgenici Leghorn „rumpless complet" (%) Frequecy of the numerical cromozomal changes of the „completely rumpless" transgenic mutants chicks

Sex (Sex)	Pui (Chicks) n	Metafaze (Metaphase) -n	Haploidie (Haploidies)		Trisomie 3 (Trisomy 3)		Trisomie 4 (Trisomy 4)	
			mn-mx	$\bar{X}$	mn-mx	$\bar{X}$	mn-mx	$\bar{X}$
♂	4	133	11,1–30,6	18,15	2,6–3,7	2,25	7,4–25	6,01
♀	9	280	4,0–48,0	22,60	2,4–14,8	5,35	2,4–14,3	6,8

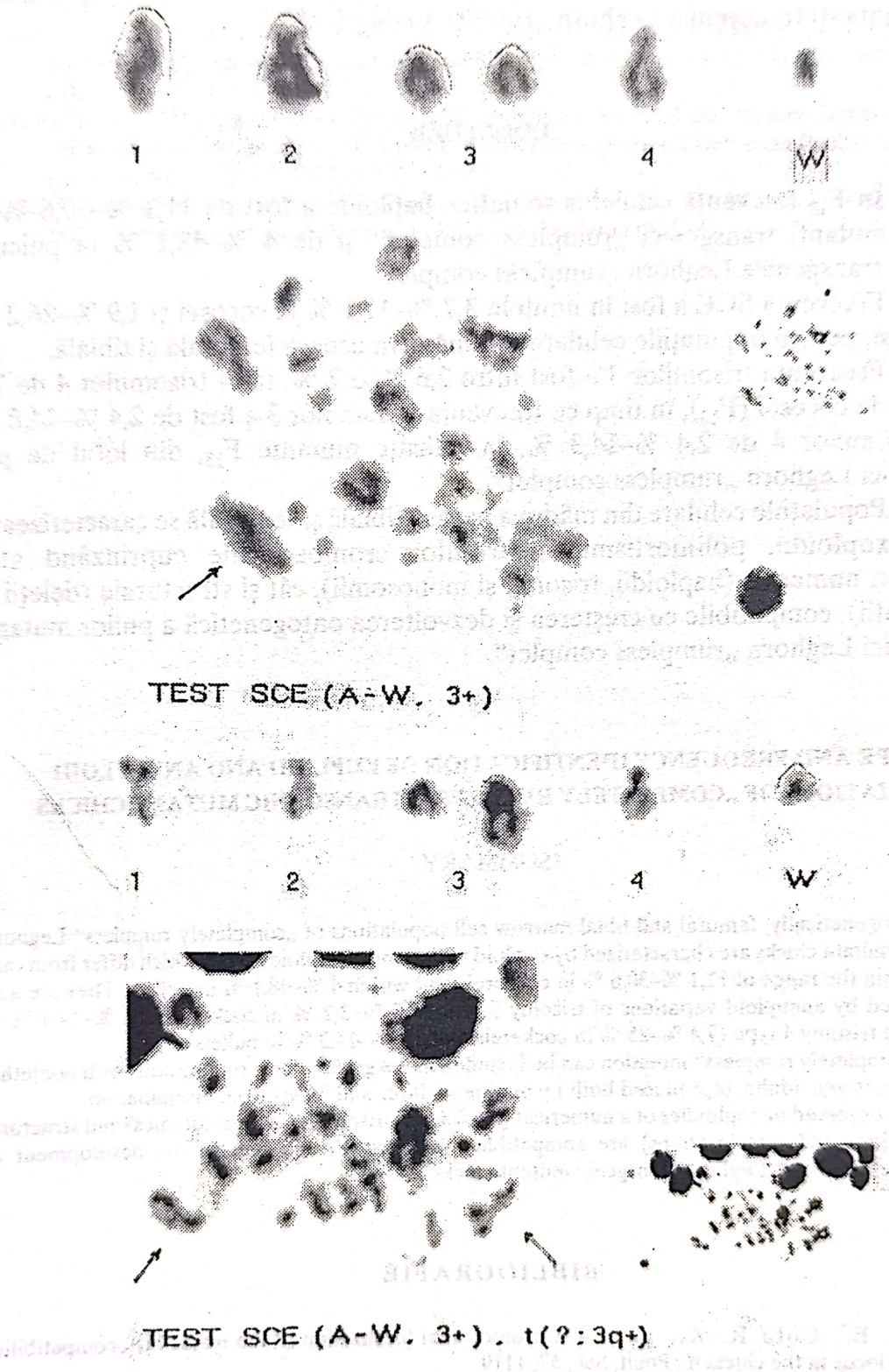


Fig. 2 – Cariotipuri parțiale ale metafazelor mitotice haploide din măduva femurală la pui mutanți transgenici „rumpless complet" (Partial karyotypes of haploid mitotic metaphases of femural marrow in „completely rumpless" transgenic mutant chicks)

Scanned with OKEN Scanner

Mixoploidia, pentru limitele de frecvenţe menţionate, care diferă de la un individ la altul, este compatibilă deci cu creşterea şi dezvoltarea ontogenetică a puilor mutanţi transgenici Leghorn „rumpless complet".

CONCLUZII

▼ În F_{13} frecvenţa celulelor somatice haploide a fost de 11,1 %–30,6 % la cocoşei mutanţi transgenici „rumpless complet" şi de 4 %–48,1 % la puicuţe mutante transgenice Leghorn „rumpless complet".

▼ Frecvenţa SCE a fost în limitele 3,7 %–11,1 % la cocoşei şi 1,9 %–26,2 % la puicuţe, pentru populaţiile celulare din măduva osoasă femurală şi tibială.

▼ Frecvenţa trisomilor 3 a fost între 2,6 %–3,7 %, iar a trisomiilor 4 de 7,4 %–25 % la cocoşei (F_{13}), în timp ce frecvenţa trisomiilor 3 a fost de 2,4 %–14,8 % şi a trisomiilor 4 de 2,4 %–14,3 %, la puicuţe mutante F_{13}, din lotul de pui transgenici Leghorn „rumpless complet".

▼ Populaţiile celulare din măduva osoasă tibială şi femurală se caracterizează prin mixoploidii, polimorfismul aberaţiilor cromozomiale cuprinzând atât modificări numerice (haploidii, trisomii şi monosomii), cât şi structurale (deleţii şi translocaţii), compatibile cu creşterea şi dezvoltarea ontogenetică a puilor mutanţi transgenici Leghorn „rumpless complet".

TYPE AND FREQUENCY IDENTIFICATION OF EUPLOID AND ANEUPLOID VARIATIONS OF „COMPLETELY RUMPLESS" TRANSGENIC MUTANT CHICKS

SUMMARY

Cytogenetically, femural and tibial marrow cell populations of „completely rumpless" Leghorn transgenic mutant chicks are characterized by euploid variations of haploidy types which differ from case to case within the range of 11,1 %–30,6 % in cockerels and within 4 %–48,1 % in pullets. They are also characterized by aneuploid variations of trisomy 3 type (2,6 %–3,7 % in cockerels; 2,4 %–14,8 % in pullets) and trisomy 4 type (7,4 %–25 % in cockerels and 2,4 %–14,3 % in pullets).

„Completely rumpless" mutation can be included in the group of macromutations with nonlethal efects on chiks and adults, reproduced both by mating on litter and by artificial insemination.

The observed mixoploidies of a numerical (haploidies, trisomies and monosomies) and structural type (deletions and translocations) are compatible with growth and ontogenetic development of „completely rumpless" Leghorn transgenic mutant chicks.

BIBLIOGRAFIE

Bloom S. E., Cole R. K., 1978 – Chromosomal localization of the major histocompatibility (B) locus in the chicken.. Poult, Sci., 57, 1119.

Mateescu, V. Mocanu D., MitranM., 1984 – Metodă de transfer a ADN heterolog la păsări. Invenţie R.S.R., nr. 87268/1984.

MateescuV., 1989 – Folosirea tehnicii SCE (schimburile între cromatidele surori) în scopul evidenţierii acţiunii transferului dirijat de ADN heterolog la nivelul macrocromozomilor de *Gallus domesticus*. Lucr. şt. ICPCPAM, 1989, VI; 49–56.

Scanned with OKEN Scanner

Mateescu V., 1992 – Some aspects and interests for the study of Rp, Rp–2 active mutant genes in a genetically transformed Leghorn fowls. Proceedings of Sixth AAAP Animal Science Congress, 23–28 nov. 1992, Bangkok, Tailanda, vol. III; p. 77.

Mateescu V., Micu I., 1994 – Haploidia la pui mutanți transgenici Leghorn „rumpless complet". Al XVIII-lea Simpozion Național de Genetică Vegetală și Animală, 13–15 iunie, 1994, Timișoara (a).

Mateescu V., Micu I., 1994 – Cytogenetic analysis of the tibial and femural bones marrow by chicken with some hereditary skeletal disorders. Proceedings 9th European Poultry Conference, Glasgow, august 7–12th 1994, p. 341–342 (b).

Raicu P., Anghel I., Stoian V., Duma D., Taisescu E., Badea E., Gregorian L., 1983 – Genetica-Metode de laborator, 1983, Ed. Academiei R.S.R.

Scanned with OKEN Scanner

TRANZIȚII FIZICE ALE ADN-ului AVIAR ÎN FUNCȚIE DE SPECIE ȘI GRADUL DE MUTAGENEZĂ

ILEANA MICU, VIRGINIA MATEESCU*

Posibilitatea adaptării și răspunsului indivizilor și populațiilor la variația factorilor externi aleatori sau impuși este un proces fiziologic, anatomic și comportamental ce depinde de reacția genotipului reflectat la nivel molecular și celular (Acar și colab., 1993; Glück și Taylor, 1993).

Acizii nucleici, ca sediu al informației genetice, sunt direct implicați în procesele biologice fundamentale ale organismului, interacțiunile sistemelor vii cu agenții exogeni depinzând în mare măsură de macromoleculele de ADN și de sistemele enzimatice de reparare (Xiong și colab., 1993).

Studii privind proprietățile fizice ale acizilor nucleici și influența radiațiilor electromagnetice asupra acestor proprietăți au fost efectuate încă din anii '80. Astfel, s-a demonstrat prin măsurători electro-optice că în câmp electric elicea dublă de ADN își schimbă orientarea (Nucitelli și Erichson, 1985). Porsche a demonstrat că dublul helix al ADN-ului este asociat cu un moment dipolar neobișnuit de mare (Porsche, 1989) și același autor a stabilit că pentru același motiv, ADN-ul reacționează puternic la pulsuri ale câmpului electric.

În 1986, Rodriquez, a caracterizat din punct de vedere termodinamic ADN-ul, stabilind parametrii termodinamici ai denaturării. A. Munteanu (1987), a studiat interacția ADN-ului cu câmpuri de microunde și a pus în evidență procesele vibraționale interne ale moleculei.

Studii privind denaturarea și renaturarea ADN-ului în urma acțiunii factorilor exogeni, în special radiații ionizante au fost efectuate de diferiți cercetători în țara noastră și în străinătate (Spiro, 1993; Belyaev și Alipov, 1992). Au fost realizate puține studii comparative privind proprietățile fizice și

* Institutul de Cercetare și Producție pentru Păsări și Animale Mici, Balotești.

răspunsul macromoleculelor de ADN aviar în urma acţiunii factorilor externi (Epplen şi colab., 1978; Darnell şi colab., 1990).

Scopul acestei lucrări este cunoaşterea comparativă a modificărilor induse în structura ADN-ului extras şi purificat din eritrocite şi hepatocite de *Gallus domesticus, Numida meleagris* şi *Coturnix coturnix,* pentru stabilirea gradului de integritate şi a particularităţilor de răspuns a macromoleculelor de ADN la agenţi fizici exogeni, radiaţii ionizante, câmp electric şi creşterea de temperatură.

MATERIALUL ŞI METODA DE CERCETARE

S-a studiat efectul radiaţiilor UV, al câmpului electric de intensitate E = 33 V/cm şi efectul creşterii temperaturii de la 22°–110°C, asupra a 5 tipuri de ADN aviar, extras şi purificat din eritrocite de *Numida meleagris,* păsări Leghorn şi păsări transgenice Leghorn rumpless şi din hepatocite de *Coturnix coturnix* şi *Cornish Roşu.*

Macromoleculele de ADN aviar au fost suspendate în soluţie 0.154 M NaCl, pH 7.

Pentru iradieri s-a folosit o lampă UV, de la microscopul optic MC 1–I0 R. Iradierile s-au efectuat în cuve de cuarţ, cu drum optic de 1 cm, aflate la distanţa de 15 cm de sursă. Primul interval de iradiere a fost de 30 de minute, după care probele au fost expuse din nou radiaţiilor UV, timp de 30 de minute în prezenţa unui ligand specific (10^{-5} M acridin orange).

Pentru studiul efectului câmpului electric asupra macromoleculelor de ADN aviar s-a folosit o instalaţie alcătuită dintr-o sursă de tensiune de 0–300 V în serie cu o cuvă de plexiglass cu electrozi de nichel.

Referitor la efectul creşterii temperaturii s-a studiat tranziţia termică a celor 5 tipuri de ADN între 22–110°C, prin trasarea cineticii curbelor de denaturare a ADN-ului între 200 nm–400 nm la spectrofotometrul SPECORD M-40.

Au fost trasate spectrele de absorbţie în intervalul 200–400 nm înainte şi după acţiunea independentă a celor 3 factori fizici asupra suspensiilor de ADN aviar.

S-a realizat analiza spectrofotometrică, a cuplării colorantului acridin organe (10^{-5} M) cu macromoleculele de ADN. Acridin orange-ul are proprietatea de a se intercala între perechile de baze purinicil şi pirimidinice, modificând spectrul de absorbţie al ADN-ului funcţie de integritatea macromoleculelor de ADN.

Au fost calculate în modificările cantitative în spectrul de absorbţie al suspensiilor de ADN, pentru a cunoaşte cinetica degradării macromoleculelor de ADN, ca rezultat al acţiunii celor 3 factori aplicaţi, folosind următoarele formule:

$$\%A = (Ai - Ao) \times 100/Ao$$

în care:

Ai = absorbţia probei la timpul i după acţiunea agenţilor exogeni;
Ao = absorbţia iniţială a probei;

$\frac{Ai}{Ao}$ = valoarea absorbţiei relative a probelor de ADN;

%A = creşterea la sută a absorbţiei probelor de ADN.

Hipocromicitatea:

$$H = \frac{(A\ 260\ nm\text{-}A\ 320\ nm)\ 60^{\circ}C}{(A\ 260\ nm\text{-}A\ 320\ nm)\ 18^{\circ}C}$$

Cantitatea de guanină-citozină:

$$GC\ (\%) = 2.44 \times (Tm - 53{,}9).$$

A fost realizată analiza statistică a datelor: varianţa, deviaţia standard, corelaţia şi testul t – student folosind programul Excel 5.0 editat de Microsoft (Windows).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele studiilor comparative privind efectul radiaţiilor UV, al câmpului electric şi creşterii temperaturii asupra macromoleculelor de ADN extrase şi purificate din eritrocite de *Numida meleagris,* păsări Leghorn şi păsări transgenice Leghorn şi din hepatocite de *Coturnix coturnix* şi *Cornish roşu* sunt redate în tabelele 1–4 şi figura 1.

Analiza cantitativă a spectrelor de absorbţie ale suspensiilor de ADN în urma intracţiunii cu radiaţii UV (tabelul 1) a arătat că după 30 minute de iradiere are loc o descreştere a absorbţiei optice a probelor de ADN (efect hipocromic) datorată ionizării şi lezării grupărilor moleculare existente în structura acestuia. Astfel, creşterea absorbţiei optice a probelor variază între –3% şi –12% pentru eritrocite şi

Tabelul 1

Schimbări cantitative în spectrul de absorbţie al ADN-ului în timpul iradierii
(Quantitative changes of DNA absorption spectrum during the irradiation)

ADN din: (DNA from:)	D.O.				A/Ai				A %			
	0 min.	30 min.	10^{-5} M acridin orange	30 min.	0 min.	30 min.	10^{-5} M acridin orange	30 min.	0 min.	30 min.	10^{-5} M acridin orange	30 min.
Eritrocite Leghorn	0,527	0,5103	0,6763	0,6956	1	0,9686	1,2833	1,3199	0	- 3,1688	28,3301	31,9924
Eritrocite Leghorn rumpless	0,5195	0,4641	0,7594	0,7094	1	0,8933	1,4617	1,3655	0	-10,6641	46,179	36,5543
Eritrocite *Numida meleagris*	0,4464	0,3925	0,5359	0,5872	1	0,8792	1,4245	1,3154	0	-12,0743	42,4507	31,5412
Hepatocite *Coturnix coturnix*	0,4498	0,3818	0,5656	0,5338	1	0,8488	1,2574	1,1867	0	-15,1178	25,7474	18,6749
Hepatocite Cornish roşu	0,3691	0,226	0,429	0,403	1	0,6123	1,1622	1,0918	0	-38,7699	16,2286	9,1869
Varianţa	0,0166	0,0117	0,0163	0,0158		0,1182	0,0152	0,0128		181,94	152,8337	128,3759
Deviaţia standard	0,06433	0,1081	0,1279	0,1259	0	0,1349	0,1236	0,1133	0	13,488	12,3625	11,33031
t-test		0,01574	0,0067	0,0062		0,028	0,00227	0,0036		0,028	0,00226	0,0036

Scanned with OKEN Scanner

între –15% şi –38% pentru hepatocite, iar raportul coeficienţilor de absorbţie A/Ai este subunitar. În urma intercalării acridinului orange între perechile de baze azotate, are loc creşterea absorbţiei optice a macromoleculelor de acid dezoxiribonucleic dependentă de tipul ADN-ului (varianţa este de 152,83, iar deviaţia standard 12,36) şi de proprietăţile structurale ale acestuia. După iradierea probelor de ADN timp de 30 min în prezenţa acridin orangeu-lui au loc deplasări hipercrome ale benzilor de absorbţie optică ale macromoleculelor de ADN eritrocitar provenit de la păsări Leghorn şi deplasări hipocrome pentru celelalte tipuri de ADN. Varianţa probelor este de 128,37, iar deviaţia standard de 11,33.

Testul t-student a pus în evidenţă diferenţe distinct semnificative între valorile parametrilor optici ai probelor de ADN rezultate în urma iradierii ($P < 0,005$).

Schimbările cantitative în spectrul de absorbţie electronică a macromoleculelor de ADN aviar în urma acţiunii câmpului electric de intensitate E 30 V/cm sunt redate în tabelul 2. Se observă că macromoleculele de ADN de origine diferită se denaturează ireversibil în urma interacţiei cu câmpul electric, datorită ruperii legăturilor de hidrogen şi a trecerii de la structura bicatenară la structura monocatenară.

Raportul coeficienţilor de absorbţie este supraunitar şi variază între 1,03 pentru hepatocite şi 1,31 pentru ADN extras din eritrocite de *Numida meleagris*, iar creşterile absorbţiei optice a probelor sunt între 3% pentru hepatocite şi 31% pentru eritrocite.

Varianţa creşterii procentuale a absorbţiei probelor este de 195, iar deviaţia standard 13,97, datorită diferenţelor existente între structura secundară a acizilor nucleici. După legarea acridin orange-ului 10^{-5} M şi aplicarea câmpului electric

Tabelul 2

Schimbări cantitative în spectrul de absorbţie electronică a macromoleculelor de ADN aviar în urma acţiunii câmpului electric E(=30 V/cm)

(Quantitative changes of electronic absorption spectrum of avian DNA macromolecules as a results of the action of the electric field)

ADN din: (DNA from:)	Concentraţia (Concentration)	D.O.			A/Ai			A %		
	µg/ml	0	30V/cm	10^{-5} M acridin orange 30V/cm	0	30V/cm	10^{-5} M acridin orange 30V/cm	0	30V/cm	10^{-5} M acridin orange 30V/cm
Eritrocite Leghorn	22,3	0,5714	0,7174	0,8240	1	1,255	1,4420	0	25,5512	44,2072
Eritrocite *Numida meleagris*	22,5	0,5745	0,7531	0,9144	1	1,3108	1,5916	0	31,0879	59,1644
Hepatocite *Coturnix coturnix*	21,5	0,5428	0,5623	0,6499	1	1,035	1,1973	0	3,5924	19,7310
Varianţa		0,00029	0,006	0,0091	0	0,0151	0,02105	0	195,2189	404,8575
Deviaţia standard		0,01747	0,07966	0,0956		0,12306	0,1451		13,972	20,12107
t-test			0,014*	0,003**		0,0066**	0,00155***		0,019*	0,005**

Tabelul 3

Schimbări cantitative în spectrul de absorbție al ADN-ului în urma tranzițiilor termice
(Quantitative changes of DNA absorption spectrum as a result of thermic transitions)

Nr. crt.	Temperatura (Temperature) °C	ADN eritrocite *Numida meleagris*		ADN hepatocite *Coturnix coturnix*		ADN eritrocite *Leghorn*		ADN eritrocite *Leghorn rumpless*		ADN hepatocite *Cornish Roșu*	
		$\frac{A}{Ai}$	A %	$\frac{A}{Ai}$	A %	$\frac{A}{Ai}$	A %	$\frac{A}{Ai}$	A %	$\frac{A}{Ai}$	A %
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	22	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
2	36	–	–	1,0324	3,2436	1,0955	9,5511	1,0614	6,1476	1,0024	0,2490
3	40	1,029	2,9949	–	–	–	–	–	–	1,0278	2,7888
4	42	1,1064	10,6414	1,0318	3,1820	1,1297	12,9720	1,1082	10,8274	–	–
5	47	–	–	1,1377	13,7754	1,1929	19,2939	1,1142	11,4231	–	–
6	49	1,3906	39,0611	–	–	1,2361	23,6179	–	–	1,0697	6,9721
7	54	1,4381	43,8190	1,0802	8,0270	–	–	–	–	1,0582	5,8266
8	60	1,5424	54,2480	–	–	1,2898	28,9819	1,1423	14,2310	1,0480	4,8057
9	66	1,6028	60,2803	1,0858	8,5814	1,3232	32,3207	1,2516	25,1648	–	–
10	72	1,6637	66,3763	–	–	1,3850	38,5057	–	–	1,0450	4,5069
11	74	–	–	1,1081	10,8191	–	–	–	–	–	–
12	80	1,7372	73,7255	–	–	1,4469	44,6907	–	–	1,1130	11,3047
13	84	1,8596	85,9600	1,1796	17,9634	1,4354	43,5413	–	–	–	–
14	88	1,9609	96,0917	–	–	1,4822	48,2211	1,3350	33,5035	1,1526	15,2639
15	94	2,0802	108,0288	1,2625	26,2574	1,6455	64,5593	1,3939	39,3958	1,1845	18,4511
16	95	2,1537	115,3780	–	–	–	–	–	–	–	–
17	97	2,2536	125,3610	–	–	1,7337	73,3716	–	–	1,2248	22,4850
18	100	2,3194	131,9456	1,3235	32,3547	1,8527	85,2764	1,4596	45,9689	1,2460	24,6015
19	101	2,5212	152,1240	1,3366	33,6686	2,1176	111,7679	1,4399	43,9906	1,5468	54,6812
Varianța		0,2192	2192,05	0,0139	139,22	0,0933	933,375	0,028	306,2016	0,02218	221,82
Deviația standard		0,4682	46,819	0,117	11,799	0,305	30,551	0,167	17,498	0,1489	14,894
t-test între ADN Numida meleagris și celelalte tipuri de ADN				0,000156***	$7{,}79 \cdot 10^{-5}$***	0,0405*	0,02026*	0,0009***	0,00052***	0,00013***	$6{,}49 \cdot 10^{-5}$***
t-test ADN *Coturnix coturnix* și celelalte tipuri de ADN		0,000156***			0,00010***	0,0042**	0,0021**	0,095n.s.	0,090n.s.	0,322n.s.	0,419n.s.
t-test ADN Leghorn și celelalte tipuri de ADN		0,02*	0,0202*	0,002**	0,0021**	0,0202*	–	0,026*	0,03*	0,0017**	0,0017**
t-test ADN Leghorn rumpless și celelalte tipuri de ADN		0,0004***	0,00052***	0,095n.s.	0,090n.s.	0,026*	0,0312*	–	–	0,07998n.s.	0,0759n.s.
t-test ADN Cornish Roșu și celelalte tipuri de ADN		$6{,}5 \cdot 10^{-5}$**	$6{,}48 \cdot 10^{-5}$***	0,419n.s.	0,419n.s.	0,0017**	0,00178**	0,079n.s.	0,0759n.s.		

Scanned with OKEN Scanner

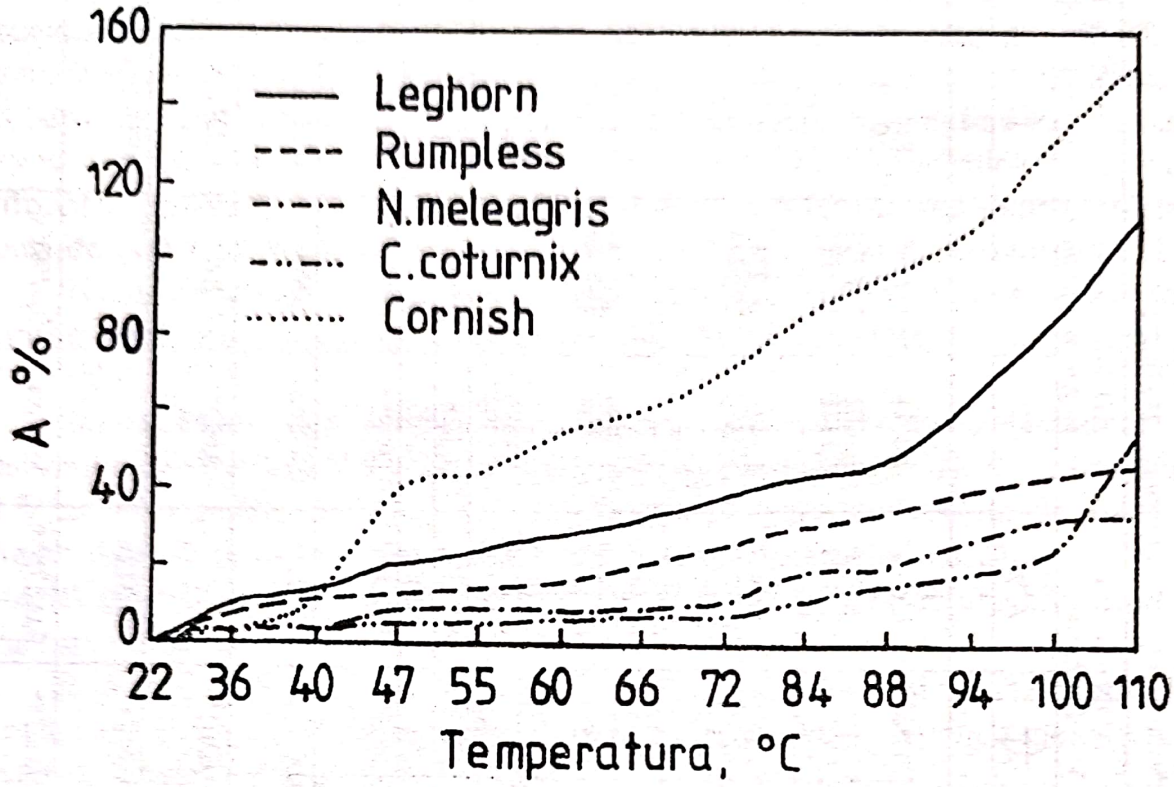


Fig. 1 – Schimbări cantitative în spectrul de absorbţie al macromoleculelor de ADN aviar în urma creşterii temperaturii.
(Quantitative changes in absorption spectrum of the avian DNA macromolecules as a result of temperature growth)

Tabelul 4

Proprietăţi fizico-chimice ale ADN-ului aviar
(Physical-chemical properties of avian DNA)

ADN din: (DNA from:)	Concentraţie ADN (DNA concentration) (µg/ml)	Punct de topire (Melting point) (T°C)	% GC	Hipercromicitate (Hypercromicity)
1. Eritrocite Leghorn	14,0	76	53,924	0,761
2. Eritrocite Leghorn transgenic rumpless	17,5	68	34,404	0,555
3. Eritrocite *Numida meleagris*	18,5	80	63,68	0,7075
4. Hepatocite *Coturnix coturnix*	18,8	74	49,044	0,855
5. Hepatocite Cornish Roşu	17	72	44,16	0,522
6. Varianţa	3,653	20	119,05	0,01963
7. Deviaţia standard	1,911	4,47	10,91	0,1401

Scanned with OKEN Scanner

asupra celor 3 probe de suspensii de ADN, parametrii spectrali ai ADN-ului se modifică.

Astfel, testul t-student a pus în evidenţă diferenţe semnificative $P < 0,01$ şi distinct semnificative $P < 0,001$ între densităţile optice, raportul coeficienţilor de absorbţie şi creşterea absorbţiei probelor înainte şi după acţiunea câmpului electric şi după legarea cu acridin organe şi interacţia cu câmpul electric.

Varianţa probelor este în acest caz 404,85, iar deviaţia standard 20,12 datorită faptului că legarea acridin orange-ului este dependentă de gradul de denaturare şi de structura macromoleculelor de acid dezoxiribonucleic.

Proprietăţile fizico-chimice şi spectrale ale celor 5 tipuri de ADN aviar în urma tranziţiilor termice sunt redate în figura 1 şi tabelele 3 şi 4.

Se observă că începând cu temperaturi de 60°C au loc modificări semnificative ale parametrilor spectrali exprimaţi prin raportul absorbţiei probelor şi prin creşterea % a absorbţiei macromoleculelor de ADN în suspensie, datorită trecerii de la structura bicatenară ADN-ului la cea monocatenară.

Pentru raportul coeficienţilor de absorbţie varianţa probelor variază între 0,01 pentru ADN extras din hepatocite de *Coturnix coturnix* şi 0,2192 pentru ADN din eritrocite de *Numida meleagris.*

Testul t-student a arătat că există diferenţe foarte semnificative $P < 0,001$ între ADN-ul extras din eritrocite de *Numida meleagris* şi celelalte tipuri de ADN.

Coeficienţii de corelaţie calculaţi între proprietăţile fizico-chimice ale celor 5 tipuri de ADN au fost între punctul de topire şi cantitatea de guanină-citozină % $r = 1$, între punctul de topire şi hipocromicitate $r = 0,556$ şi între hipocromicitate şi % GC, $r = 0,557$.

De asemenea, coeficienţii de corelaţie dintre proprietăţile fizico-chimice ale macromoleculelor de ADN şi parametrii spectrali ai probelor în urma acţiunii câmpului electric au fost cuprinşi între $r = 70$ şi $r = 86$.

Valorile coeficienţilor de corelaţie au arătat că reactivitatea macromoleculelor de ADN la acţiunea factorilor exogeni depinde de proprietăţile intrinseci ale acestora şi îşi au originea în compoziţia heterogenă a bazelor purinice şi pirimidinice ce caracterizează speciile aviare.

CONCLUZII

▼ Macromoleculele de ADN de origine diferită (eritrocite de *Numida meleagris,* de Leghorn şi Leghorn transgenic rumpless şi hepatocite de *Coturnix coturnix* şi *Cornish Roşu)* prezintă particularităţi de denaturare la agenţi fizici de tipul UV, câmp electric şi temperatură în funcţie de compoziţie şi ordinea bazelor purinice şi pirimidinice şi structurile ADN-ului.

Scanned with OKEN Scanner

PHYSICAL TRANSITIONS OF THE AVIAN DNA AS A FUNCTION OF THE SPECIES AND THE MUTAGENESSES LEVEL

SUMMARY

The physical behaviour of the dezoxiribonucleic acid extracted and purified from erythrocytes, and hepatocytes of Coturnix coturnix, Numida meleagris and Gallus domesticus, following the independent action of the UV radiations, electric field (30 V/cm) and thermical transition between 20–110°C was studied.

In order to know the kinetics of the degradation of the DNA macromolecules, there were calculated the quantitative changes in the DNA absorption spectra and the spectrophotometric analysis of the binding with the specific ligand: acridin orange 10^{-5} M. There were also calculated: the hypocromicity, the melting point, the guanine-cytosine quantity and the percentage of the increase of the optical density.

The maximum denaturalization of the DNA macromolecules are 70% after irradiation, 150% following the electric field action and 48% as effect of the thermal transition.

The results which have been obtained indicated that DNA macromolecules from different origin, have degradation particularities by the physical agents of the type: UV radiations, electric field and temperature as a function of the composition and order of the purinic and pirimidinic bases.

The present investigations support the experiences of transfer of the genetical information.

BIBLIOGRAFIE

Acar N., Moran E. T jr., Mulvaney D. R., 1993 – Breast muscle development of commercial broilers from hatching to twelve weeks of age. Poultry Science 72: 317–325.

Belyaev I. Ya, Alipov D. Ye., 1992 – Genome role in physical mechanism of cell response to low intensive electromagnetic field. 9th Balkan Biochemical and Biophysical Days, Greece, Proceedings 1 : 195.

Christova R., 1992 – Crosslinking of DNA to nuclear laminas by UV-lazer, 9th Balkan Biochemical Biophysical Days, Greece, Proceedings 1 : 150.

Darnell J., Lodish H., Baltimore D., 1990 – DNA, replication, repair and recombination. Molecular Cell Biology, Scientific American Books: 474–475.

Epplen T. I., Leipoldt M., Engel W., Schmidtke J., 1978 – DNA requence organization in avian genomes, chromosomes (Berl) 69 : 307–321.

Gluck B., Taylor R., 1993 – The cellular and fluid microenvironment of immune tissues, Poultry Science 72 : 1259–1261.

Lunden A., Edfors-Liljy L., Johansson K., 1993 – Associations between major histocompatibility complex genes and production traits in white Leghorn. Poultry Science 72 : 989–999.

Munteanu C., Bonciu G., 1992 – Effects of macromolecular concentration on the micromouve absorption of DNA in a aqueous solution, 9th Balkan Biochemical Biophysical Days Greece. Proceedings 1 : 135.

Nucitelli E., Erichson C. A., 1985 – Electromagnetic field influence on membranes. Exp. Cell. Res. 147 : 195–202.

Spiro M., Babani F., 1992 – Spectroscopie data and mass – spectra of adducts formed in reactions of a dial expoxide of benz (A) – anthracene with nuclei acid. 9th Balkan Biochemical Biophysical Days, Greece, Proceedings 1 : 141.

Xiong Y. I., Cantor A. H., Pescatore A. I., 1993 – Variation in muscle chemical composition pH and protein extractability among eight different broiler crosses. Poultry Science 72 : 583–588.

Scanned with OKEN Scanner